



Universidade de Aveiro Departamento de Ambiente e Ordenamento
2018

**Catarina Bravo
Madeira**

**Utilização de macrófitas flutuantes como biofiltro em
sistemas aquáticos contaminados**



**Catarina Bravo
Madeira**

**Utilização de macrófitas flutuantes como biofiltro em
sistemas aquáticos contaminados**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente realizada sob a orientação científica da Doutora Teresa Filomena Vieira Nunes, Professora associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro e do Doutor Nelson José Cabaços Abrantes, Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro e do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.

The most important thing for everyone in Gringolandia is to have ambition and become 'somebody,' and frankly, I don't have the least ambition to become anybody.

Frida Kahlo

O júri

Presidente

Prof. Doutor Mário Miguel Azevedo Cerqueira

Professor Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Vogal- Arguente Principal

Doutora Maria de Fátima Tavares de Jesus

Bolseira de Investigação Pós-Doutoramento do Centro de Estudos de Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogal – Orientadora

Prof.^a Doutora Teresa Filomena Vieira Nunes

Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Esta dissertação marca o final de um ciclo assim como o início de um novo. A jornada foi incrível, acompanhada por altos e baixos, os quais, creio, que me tornaram numa pessoa melhor.

Deixo o meu agradecimento à Prof. Doutora Teresa Nunes e ao Dr. Nelson Abrantes, por me acompanharem neste processo de aprendizagem. O meu sincero obrigada por toda a disponibilidade, exigência e pela imensa paciência prestada.

Não tenho palavras para agradecer à Ana Ré por toda sapiência, otimismo, disponibilidade e companheirismo partilhados pois foi definitivamente uma das peças fundamentais para este trabalho. Um enorme obrigada por ser uma inspiração a nível profissional e a nível pessoal.

O meu obrigada também à Vera Silva, que apesar de apenas ter estado fisicamente presente nos primeiros tempos, ajudou-me muito numa fase inicial do trabalho, assim como me ensinou a lidar com situações que futuramente acabaram por acontecer.

Não posso deixar de dirigir um agradecimento sentido, à Isabel Campos, que sempre esteve disponível para as minhas dúvidas e sempre me mostrou a pensar fora da caixa em inúmeras situações.

Deixo o meu especial agradecimento à Ana Luísa, pelo seu coração enorme, o qual me ajudou a ultrapassar todos os momentos de uma forma mais otimista, realista e feliz. É bom sentir que existem pessoas genuinamente boas. Obrigada.

A todas as pessoas do departamento de biologia que me ajudaram, obrigada pela simpatia e disponibilidade, foram exemplares. Queria agradecer particularmente, à Fátima, por toda a disponibilidade e pela incrível energia transmitida.

Por fim, e especialmente importante, à minha família e aos meus amigos, pois foram e serão sempre a base de tudo na minha vida. Obrigada pelo amor e luz. Obrigada a cada um de vós singularmente por serem as melhores pessoas do mundo!

Palavras-chave

Bioacumulação; *Lemna minor*; metais; extratos de cinzas de incêndios florestais; efluente pasta e papel.

Resumo

A elevada taxa de crescimento da população aliada a um aumento da industrialização tem contribuído para a degradação do meio aquático através de descargas de águas residuais, industriais e domésticas. Igualmente, a ampla ocorrência de incêndios florestais em Portugal tem conduzido à contaminação dos sistemas aquáticos. Deste modo, os corpos de água são alvo de especial atenção dado que são os principais recetores finais para os contaminantes.

Um dos grupos de contaminantes que requer especial atenção na contaminação das massas de água devido às suas propriedades são os metais, dado que apresentam elevada persistência ambiental, potencial efeito tóxico e capacidade de bioacumulação e bioamplificação.

Deste modo, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial de fitorremediação da macrófita *Lemna minor* em dois cenários de contaminação distintos: extratos de cinzas de incêndios florestais e efluente de indústrias de pasta e papel. Em termos de objetivos específicos, foram definidos os seguintes objetivos: i) caracterização química das matrizes em estudo; ii) determinação da sensibilidade/tolerância da macrófita *L. minor* quando exposta às matrizes em estudo através do uso de ferramentas ecotoxicológicas; e iii) avaliar a eficiência de remoção dos contaminantes pela macrófita, nomeadamente Fe, Zn e Mn.

Os resultados obtidos revelaram que a planta teve um baixo desempenho na acumulação dos metais quando exposta aos extratos de cinzas dos incêndios florestais, não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos com e sem plantas. Já quando exposta ao efluente da indústria da pasta e papel, a planta revelou alguma acumulação de Fe nos primeiros dias, mas a sua fraca performance ao longo dos 15 dias de exposição revelou que a sua função de acumuladora foi comprometida. Já no caso do Mn, e ainda que de forma inconstante, verificou-se que a planta desempenhou o seu papel de acumuladora.

Em suma, os resultados obtidos revelam que a eficiência da *L. minor* na remoção de metais de matrizes complexas foi comprometida para os cenários e matrizes testados, o que pode estar relacionado com a toxicidade implícita das matrizes e/ou com a limitação de nutrientes. Neste sentido, será importante otimizar as condições de exposição de modo a promover a natural função acumuladora da planta.

Keywords

Bioaccumulation; *Lemna minor*; metals; aqueous extracts of ashes; effluent from pulp and paper.

Abstract

The high population growth rate coupled with an increase in industrialization has contributed to the degradation of the aquatic environment through discharges of wastewater, industrial and domestic. Similarly, the wide occurrence of wildfires in Portugal has led to contamination of aquatic systems. In this way, the bodies of water are the target of special attention given that they are the main final receivers for contaminants. One of the groups of contaminants that requires special attention in the contamination of the water masses due to its properties are metals, since they present high environmental persistence, potential toxic effect and bioaccumulation and bioamplification capacity. This work had as main objective to evaluate the phytoremediation potential of *Lemna minor* in two different contamination scenarios: Aqueous extracts of ashes and effluent from pulp and paper industries. In terms of specific objectives, the following objectives were defined: i) chemical characterization of the matrices under study; II) Determination of the sensitivity/tolerance of *L. minor* when exposed to the matrices under study using ecotoxicological tools; and III) to evaluate the efficiency of contaminants removal by macrophyte, namely Fe, Zn and Mn. The results showed that the plant had a low performance in the accumulation of metals when exposed to ash extracts from forest fires, not Significant differences were observed between treatments with and without plants. When exposed to the pulp and paper industry effluent, the plant revealed some accumulation of Fe in the early days, but its poor performance over the 15 days of exposure revealed that its accumulator function was compromised. Already in the case of Mn, and even if inconsistently, it was found that the plant played its role as accumulator. In short, the results show that *L. Minor* efficiency in the removal of metal from complex matrices was compromised for the scenarios and matrices tested, which may be related to the implicit toxicity of the matrices and/or with the limitation of nutrients. In this sense, it will be important to optimize the exposure conditions to promote the natural plant accumulator function.

Índice

| | |
|---|-------|
| Índice de figuras..... | xvi |
| Índice de tabelas..... | xvii |
| Lista de abreviaturas..... | xviii |
| 1.1. Poluição aquática | 1 |
| 1.2. Metais..... | 2 |
| 1.3. Fitorremediação | 4 |
| 1.4. Casos de estudo | 17 |
| 1.4.1 Caso de estudo 1#: Cinzas de incêndios florestais..... | 17 |
| 1.4.1.1 Impactos dos incêndios florestais no biota aquático..... | 17 |
| 1.4.2 Caso de Estudo 2#: Efluente da indústria de pasta e papel (EIPP)..... | 19 |
| 1.4.2.1 Características do efluente gerado pela indústria de pasta e papel..... | 19 |
| 1.4.2.2 Efeitos do efluente de pasta e papel no ambiente | 22 |
| 1.5. Objetivos e motivação..... | 22 |
| 1.6. Estrutura..... | 22 |
| 2.2. Recolha de amostras preservação e preparação | 23 |
| 2.2.1 Caso de estudo #1- Cinzas de incêndios florestais..... | 23 |
| 2.2.2 Caso de estudo #2- EIPP..... | 23 |
| 2.3. Cultura e manutenção de <i>Lemna minor</i> | 23 |
| 2.4. Ensaio ecotoxicológicos | 24 |
| 2.5. Ensaio de bioacumulação | 25 |
| 3.1. Caso de estudo 1#: Cinzas de incêndios florestais..... | 29 |
| 3.1.1. Caracterização físico-química dos EAC..... | 29 |
| 3.2. Caso de Estudo 2#: EIPP | 39 |
| 3.2.1. Caracterização físico-química do EIPP..... | 39 |
| 4. Considerações finais..... | 47 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Mecanismo de tolerância para poluentes inorgânicos e orgânicos em células de <i>Lemna</i> ... | 7 |
| Figura 2 – Processo e poluentes resultantes das diferentes etapas de produção de pasta e papel. | 20 |
| Figura 3 – Evolução histórica das concentrações de N e P nos efluentes das indústrias de pasta e papel entre o período 2007- 2016..... | 21 |
| Figura 4 – Desenho experimental..... | 26 |
| Figura 5-Valores de pH (a), CE (b), CBO (c) e CQO (d) ao longo do ensaio na matriz EAC..... | 30 |
| Figura 6- Valores de NH ₃ (a) e P (b) ao longo do ensaio na matriz EAC..... | 33 |
| Figura 7-Concentração de Fe no EAC e na planta..... | 35 |
| Figura 8-Concentração de Zn no EAC e na planta..... | 37 |
| Figura 9-Concentração de Mn no EAC e na planta..... | 38 |
| Figura 10-Valores de pH (a), CE (b), CBO (c) e CQO (d) ao longo do ensaio com EIPP..... | 40 |
| Figura 11- Valores de NH ₃ (a) e P (b) ao longo do ensaio com EIPP..... | 41 |
| Figura 12-Concentração de Fe no EIPP e na planta..... | 43 |
| Figura 13-Concentração de Mn no EIPP e na planta..... | 45 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Vantagens e desvantagens da fitorremediação..... | 4 |
| Tabela 2- Família Lemnaceae..... | 6 |
| Tabela 3- Compilação de vários estudos realizados sobre o potencial de bioacumulação de metais pela espécie <i>Lemna minor</i> | 9 |
| Tabela 4- Resultados da análise de variância (ANOVA) de duas vias para os parâmetros analisados no EAC..... | 31 |
| Tabela 5- Resultados da análise de variância (ANOVA) de uma via para os parâmetros analisados em <i>Lemna minor</i> | 35 |
| Tabela 6- Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Fe ao longo do período de ensaio..... | 35 |
| Tabela 7- Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Zn ao longo do período de ensaio..... | 38 |
| Tabela 8 - Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Mn ao longo do período de ensaio..... | 39 |
| Tabela 9- Resultados da análise de variância (ANOVA) de duas vias para os parâmetros analisados no EIPP..... | 41 |
| Tabela 10- Resultados da análise de variância (ANOVA) de uma via para os parâmetros analisados em <i>Lemna minor</i> | 43 |
| Tabela 11- Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Fe ao longo do período de ensaio..... | 44 |
| Tabela 12- Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Mn ao longo do período de ensaio..... | 45 |

Lista de abreviaturas

%I - Percentagem de inibição da taxa de crescimento específico

Ag - Prata

Al - Alumínio

AO - Ácidos orgânicos

AOX - Compostos orgânicos halogenados absorvíveis

APW - Artificial Pond Water

As - Arsénio

B - Boro

Be – Berílio

c- Concentração expressa em (massa/volume)

C0 - Concentração inicial no meio

C1 - Concentração final no meio

Ca - Cálcio

CBO - Carência bioquímica de oxigénio

Cd - Cádmió

CE - Condutividade elétrica

Co - Cobalto

EAC - Extratos aquosos de cinza

EIPP- Efluente da indústria de pasta e papel

FBC- Fator de bioconcentração

Fe - Ferro

Glu - Glucose

GSH - Glutathione

HAP - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

HCl - Ácido clorídrico

Hg - Mercúrio

HNO₃ - Ácido nítrico

K - Potássio

Mg - Magnésio

Mn - Manganês

Mo - Molibdénio

MT - Metalotioneínas

N - Azoto

Na - Sódio

NA - Nicotiaminas

Nf - Peso seco final

NH₃ - Amónia

Ni - Níquel

Ni - Peso seco inicial

NO₂⁻ - Nitrito

NO₃⁻ - Nitrato

P – Fósforo

Ps- Peso seco

Sb - Antimónio

Se - Selénio

Sn - Estanho

SS - Sólidos Suspensos

t - Período de duração do ensaio

TC - Taxa de crescimento específico

TCc - Valor médio da taxa de crescimento no controlo

TCt - Valor médio da taxa de crescimento em cada concentração testada

Ti - Titânio

Tl - Tálho

V - Vanádio

W - Tungsténio

W - Concentração expressa em (massa/massa)

Zn – Zinco

Zn(NO₃)₂ - Nitrato de zinco

1. Introdução

1.1. Poluição aquática

A elevada taxa de crescimento da população aliada a um aumento da industrialização tem contribuído, substancialmente, para a degradação do meio aquático através de descargas de águas residuais, industriais e domésticas. E embora a qualidade da vida humana tenha melhorado substancialmente ao longo dos anos, é impossível ignorar que o desenvolvimento dessas atividades ocorreram à custa da qualidade ambiental (Jacob et al., 2018; Sood, Uniyal, Prasanna, & Ahluwalia, 2012; Wang & Chen, 2006).

Os ecossistemas aquáticos têm sido alvo de preocupação e estudo uma vez que são, na sua maioria, os principais recetores finais para os contaminantes (Kanoun-Boulé, Vicente, Nabais, Prasad, & Freitas, 2009).

A contaminação dos ecossistemas aquáticos pode derivar de fontes naturais (atividade geotermal, características geoquímicas e hidrológicas) ou antropogénicas (escorrências agrícolas, uso excessivo de fertilizantes e pesticidas, atividade mineira e indústria) (Jacob et al., 2018; Wang & Chen, 2006).

Deste modo é possível categorizar as fontes poluidoras que afetam a qualidade da água em: fontes pontuais e fontes difusas. As fontes pontuais têm uma origem identificável sendo desta forma mais fácil de monitorizar, são exemplo de fontes pontuais: efluente de estações de tratamento, indústrias que descarregam o seu efluente num determinado local. Relativamente às fontes difusas, também conhecidas como fontes não pontuais, os contaminantes entram nos corpos de água em locais não identificados, sendo desta forma mais difíceis de controlar, toma-se como exemplos principais: escoamentos de águas pluviais, agricultura (Jamwal, Mittal, & Mouchel, 2011; Sodré, 2012).

As indústrias têxteis, de pasta e papel, pesticidas, tintas e produtos farmacêuticos são conhecidas pelo elevado consumo de produtos químicos orgânicos e inorgânicos, característicos por possuírem diferentes composições e toxicidade (Sood et al., 2012). O facto do tratamento destes poluentes ser insuficiente e altamente dispendioso constitui também uma das principais preocupações por parte destas indústrias (Samecka-Cymerman & Kempers, 1996; Weis & Weis, 2004). No entanto, note-se que a legislação existente visa a redução da poluição através do estabelecimento de concentrações mínimas para os poluentes e coimas para os infratores, contudo estas medidas não são suficientemente rigorosas para minimizar os efeitos deste problema.

Também os incêndios são considerados uma fonte difusa na contaminação dos meios aquáticos, causando rápidos e nefastos impactos na estrutura e funcionamento dos ecossistemas. A saber: mudanças na composição das espécies, modificação do pH, alteração das concentrações de nutrientes, aceleração dos processos de erosão e lixiviação, entre outros (Certini, 2005; Lavorel, Flannigan, Lambin, & Scholes, 2007; Silva et al., 2015).

1.2 Metais

Um dos grupos de contaminantes que requer especial atenção na contaminação das massas de água devido às suas propriedades são os metais dado que apresentam elevada persistência ambiental, potencial efeito tóxico, e capacidade de bioacumulação e bioamplificação (Gifford, Dunstan, O'Connor, Roberts, & Toia, 2004; Sood et al., 2012). A este respeito, sabe-se que a bioacumulação de metais representa um risco para a saúde humana, principalmente por apresentarem características carcinogénicas e mutagénicas (Alonso et al., 2002; Boening, 1999).

Dado o risco que representam para os organismos, a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) classificou treze metais (Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Se, Tl e Zn) como poluentes prioritários. A nível europeu, alguns deles (Cd, Hg, Ni e Pb) estão também incluídos na Diretiva sobre substâncias prioritárias (Commission, 2008).

Os metais estão presentes naturalmente no meio aquático como resultado da lixiviação lenta do solo, rochas ou vegetação. Contudo, é também possível que derivem de fontes antropogénicas, provenientes de descargas industriais e domésticas (Censi et al., 2006; Zhou, Zhang, Fu, Shi, & Jiang, 2008).

Grande parte dos metais são essenciais para as plantas e animais, quando presentes no meio em baixas concentrações (micronutrientes: Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni e Co), tornando-se tóxicos, somente quando a concentração aumenta. Por outro lado, dada a sua toxicidade, alguns elementos como o Cd e Pb não são necessários, mesmo em concentrações muito baixas, para nenhuma função biológica (Kennish, 1992; Rengel, 2004). Relativamente à perigosidade dos metais, Gifford et al., (2004) enumeram alguns dos seus efeitos, nomeadamente: i) dano dos sistemas biológicos; ii) substituição de metais essenciais como cofatores, iii) inibição enzimática, iv) alterações na integridade membranar, v) danos fisiológicos, entre outros. Perante isto, os metais podem ser classificados em três categorias, nomeadamente:

- i) Elementos essenciais: Na, K, Ca, Fe, Zn, Cu, Ni e Mg.
- ii) Micro contaminantes ambientais: As, Pb, Cd, Hg, Al, Ti, W, Sn.

- iii) Elementos essenciais e simultaneamente micro contaminantes: Cr, Zn, Fe, Pb, Mn e Ni (Francis, 1994).

Através da respiração, contacto ou ingestão, os contaminantes podem entrar e acumular-se num organismo aquático, processo este denominado por bioacumulação. Quando este processo ocorre somente via respiratória a partir da água, é designado por bioconcentração. Dada a potencial bioacumulação de contaminantes nos organismos pode igualmente ocorrer a transferência de contaminantes ao longo da cadeia trófica, de tal modo que nos predadores essa concentração pode exceder a concentração presente no meio, processo este, comumente, conhecido por bioamplificação (Alexander, 1999). Apesar de muitos organismos possuírem mecanismos de destoxificação que lhes permitem lidar com a contaminação de metais, os seus sistemas biológicos podem tornar-se fisiologicamente sobrecarregados, levando a danos celulares geralmente através de processos oxidativos (Gifford et al., 2004).

Segundo Kennish (1992), os metais existem nas águas superficiais em três fases: coloidal, em suspensão e dissolvidos, apresentando-se como hidróxidos, óxidos, silicatos/sulfuretos ou adsorvidos em argila/sílica/matéria orgânica. É de realçar que a concentração dos metais dissolvidos é normalmente baixa; as formas solúveis são geralmente iões ou quelatos organo-metálicos não ionizados ou complexos.

1.2.1 Técnicas de remoção de metais

Com vista à diminuição do impacto destes elementos nos diversos sistemas, são empregues diversas técnicas de remediação, sendo que os métodos convencionais para remover metais têm-se tornado insuficientes para atender aos atuais limites regulatórios de efluentes, acrescendo ao facto de serem cada vez mais dispendiosos (Rajasulochana & Preethy, 2016).

As técnicas convencionais de remediação (como são o caso da coagulação-floculação, oxidação, precipitação química, adsorção, filtração membranar, flutuação com ozono ou peróxido de hidrogénio, etc.) caracterizam-se por serem bastante dispendiosas, por não terem capacidade suficiente para remoção de poluentes em baixas concentrações, assim como por contribuírem para a degradação do ambiente, devido a problemas secundários adjacentes ao tratamento (Volesky, 2001; Wilde & Benemann, 1993).

Assim, e no que respeita à remoção de poluentes, especialmente, associada aos metais surge a necessidade de adoção de outras alternativas mais sustentáveis, e que sejam economicamente e

ambientalmente mais eficientes, sendo a fitorremediação uma alternativa promissora, neste âmbito (Rezania, Taib, Md Din, Dahalan, & Kamyab, 2016; Sood et al., 2012).

1.3 Fitorremediação

A fitorremediação consiste na utilização natural e direta de plantas com capacidade de acumular, degradar ou eliminar poluentes (como por exemplo, metais, pesticidas ou solventes) presentes no solo, ar ou água, através das suas raízes até à parte superior da planta, sendo desta forma considerada como uma tecnologia verde (Prasad & Freitas, 2003; S. Sharma, Singh, & Manchanda, 2015).

Tomando por base as considerações e desvantagens descritas anteriormente sobre os métodos convencionais, surge a necessidade de desenvolvimento de uma técnica economicamente acessível e amiga do ambiente, melhorando desta forma a qualidade da água (Sood et al., 2012). Na tabela 1, sintetizam-se as vantagens e desvantagens associadas a esta técnica.

Tabela 1- Vantagens e desvantagens da fitorremediação. Fonte: (Sood et al., 2012).

| Vantagens | Desvantagens |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">- Baixo custo e amigo do ambiente comparado com os métodos convencionais, quer <i>in situ</i> quer em <i>ex situ</i>.- Utiliza o potencial natural inerente de plantas e microrganismos naturais para limpar locais poluídos.- Contribui para a sustentabilidade ambiental.- Pode ser utilizado para tratar locais com mais do que um poluente.- Depois do processo de fitorremediação, as plantas hiperacumuladoras poderão ser utilizadas para recuperação de metais. | <ul style="list-style-type: none">- A eficiência do tratamento é limitada pela profundidade alcançada pelas raízes.- A resposta das plantas e microrganismos varia conforme algumas condições como: o clima, temperatura, intensidade luminosa, altitude, etc.- A eficiência da fitorremediação depende do tipo de plantas para a remoção do poluente.- Existe a probabilidade dos metais reentrarem no meio ambiente. |

Para a remoção de poluentes, as plantas utilizadas devem garantir alguns pressupostos fundamentais, nomeadamente: i) rápida taxa de crescimento, ii) sistema de raízes extensivo, iii) alto rendimento de biomassa, iv) adaptação a vários habitats, v) elevada tolerância, vi) capacidade de acumular poluentes acima do solo e vii) preferencialmente serem espécies nativas (Valipour & Ahn, 2016). Adicionalmente, urge a necessidade de controlar fatores como a temperatura, o pH, a radiação solar e a salinidade da água, uma vez que poderão afetar as taxas de crescimento, peso e

tamanho das plantas aquáticas, com consequências também para a eficiência do processo de fitorremediação (Rezania et al., 2016).

Não descordando, é importante referenciar os inúmeros fatores ambientais conhecidos pela sua capacidade em alterarem a disponibilidade de metais na água para plantas aquáticas, sendo os principais modificadores: a especiação química do metal, pH, substâncias húmicas, quelantes orgânicos, presença de outros metais e aniões, força iônica, temperatura, salinidade, intensidade, nível de oxigênio e potencial de oxidação/redução (Rezania et al., 2016; Vesely & Majer, 1996).

O uso posterior da biomassa resultante da fitorremediação depende do tipo de poluente tratado. Se forem tratados poluentes orgânicos geralmente pode ser utilizada como fertilizante, tendo em conta a legislação em vigor, *mulch* ou para produção de biogás (Polprasert, 1996). Pelo contrário, o uso da biomassa produzida após o processo de fitorremediação de metais é limitado devido às características destes elementos. Alguns autores defendem que a biomassa produzida pode ser depositada em aterros ou utilizada como composto, no entanto, essas opções são contestáveis porque os metais podem ser libertados para o meio ambiente por lixiviação e outros processos naturais, responsáveis pela contaminação do solo e água, e consequentemente produzirem efeitos nos diversos organismos (Núñez-López, Meas, Gama, Borges, & Olguín, 2008). Alguns autores mencionaram que a biomassa pode ser seca, compactada e incinerada para, posteriormente, serem recuperados os metais da cinza para reciclagem (Brooks, Chambers, Nicks, & Robinson, 1998; Robinson, 1999). Por outro lado, alguns autores propuseram que a biomassa poderá ser utilizada como fonte de energia, contudo os estudos detalhados relacionados com a utilização da biomassa produzida por fitorremediação de metais são escassos (Ghosh & Singh, 2005; Keller, Ludwig, Davoli, & Wochele, 2005; Núñez-López et al., 2008).

1.3.1 Lentilha de água (duckweed)

Lentilha de água (Duckweed), nome comum para quatro géneros principais de Lemnaceae: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* e *Wolffiella* (Tabela 2) é conhecida como sendo a planta mais pequena e com crescimento mais rápido na Terra, tendo uma boa capacidade de adaptação, sobrevivendo a intervalos de pH entre 3,5 e 10,5 e a temperaturas entre os 7°C e os 35°C (Rezania et al., 2016).

Tabela 2- Família Lemnaceae. Fonte: adaptado de (Mkandawire & Dudel, 2007).

| Família | Lemnaceae | | | |
|-------------------|--|--|--|--|
| Subfamília | Lemnoideae | | Wolffioideae | |
| Gênero | <i>Lemna</i> | <i>Wolffia</i> | <i>Spirodela</i> | <i>Wolffiella</i> |
| Espécies | <i>L. gibba</i> <i>L. minor</i> <i>L. minuta</i> <i>L. trisulca</i> <i>L. turionifera</i> <i>L. aequinoctialis</i> <i>L. valdivana</i> | <i>W. borealis</i> <i>W. brasiliensis</i> <i>W. columbiana</i> <i>W. globosa</i> <i>W. arrhiza</i> | <i>S. punctata</i> <i>S. polyrrhiza</i> | <i>W. lingulata</i> <i>W. oblonga</i> |

As lentilhas de água são macrófitas flutuantes frequentemente encontradas em ecossistemas de água doce em climas temperados. Desempenham uma função ecológica importante, não só por serem produtores e estarem na base da cadeia trófica, como por constituírem uma importante fonte de alimentação de algumas aves e peixes. Além disso, providenciam ainda um importante habitat para alguns invertebrados (Drost, Matzke, & Backhaus, 2007). Estas plantas aquáticas são bastante atrativas para a realização de ensaios ecotoxicológicos, não só pelas funções ecológicas desempenhadas, como também por se tratarem de organismos fáceis de manusear e de manter em cultura laboratorial, por terem uma taxa de crescimento muito elevada em condições laboratoriais e por serem bastante sensíveis a diferentes poluentes (Drost et al., 2007).

Segundo Newete & Byrne (2016), a lentilha de água é a planta mais utilizada em ensaios de fitorremediação, comparativamente a outras macrófitas. Para além da capacidade de acumulação de metais, Ahmad, (2015) refere que os géneros de Lemnaceae melhoram significativamente a qualidade das águas residuais nos seguintes parâmetros: condutividade elétrica, fósforo e azoto total, sais suspensos totais, sólidos dissolvidos totais, carência bioquímica de oxigénio (CBO) e carência química de oxigénio (CQO).

Mkandawire & Dudel (2007) relacionaram a elevada taxa de crescimento e de renovação da *Lemna* com a rápida capacidade de absorção de uma grande quantidade de nutrientes do meio. Assim, o elevado potencial de eliminação de nutrientes é um resultado direto da rápida taxa de crescimento, sendo uma das várias propriedades exploradas para remover nutrientes excedentes de efluentes em sistemas de tratamento de águas residuais.

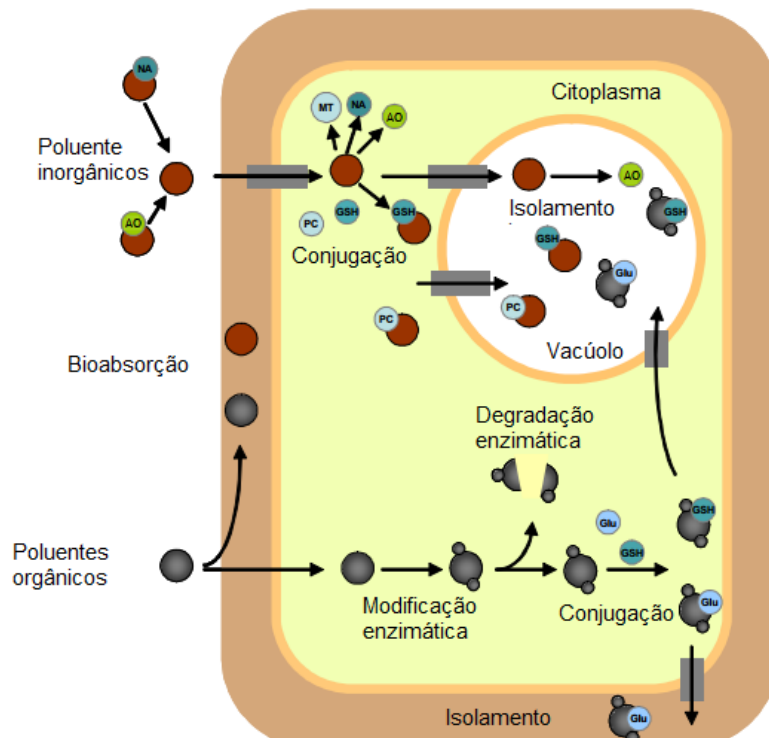


Figura 1- Mecanismo de tolerância para poluentes inorgânicos e orgânicos em células de *Lemna*.
Fonte: (Mkandawire & Dudel, 2007).

A maioria das espécies de *Lemna* são capazes de suportar concentrações elevadas de contaminantes, recolhendo-os e compartimentalizando-os, essencialmente no vacúolo ou no material da parede celular (Figura 1). A destoxificação dos compostos envolve uma recolha ativa dos mesmos tornando-os menos tóxicos, sendo os quelantes envolvidos neste processo a glutathione (GSH), a glucose (Glu), as metalotioneínas (MT), as nicotiaminas (NA), os ácidos orgânicos (AO) e as fitoquelatinas (Mkandawire & Dudel, 2007). Estes compostos orgânicos desempenham assim um papel importante na tolerância de metais para estas espécies, especificamente quando os AO integram diretamente os metais ou poluentes orgânicos, para iniciar a degradação extracelular ou fixação (Mkandawire & Dudel, 2007).

Por outro lado, alguns compostos xenobióticos, incluindo metais, podem indiretamente induzir estratégias de sobrevivência, como a floração, com vista a facilitar a dispersão e propagação nas macrófitas, permitindo assim a sobrevivência das plantas mesmo em condições adversas (Mkandawire & Dudel, 2007).

1.3.1.1 Potencialidade de *Lemna minor* como planta hiperacumuladora

Plantas hiperacumuladoras tratam-se de espécies que acumulam quantidades consideráveis de metais nos tecidos, independentemente da concentração do metal no meio. Como regra geral, as espécies consideradas hiperacumuladoras devem acumular acima de 1000 mg kg⁻¹ de biomassa seca (Mkandawire & Dudel, 2007).

Muitas macrófitas respondem a vários eventos de stress abióticos produzindo mecanismos de defesa, através dos quais existe muitas vezes diminuição da poluição da água pela absorção e degradação de compostos químicos (Materac & Sobiecka, 2017). São vários os estudos que têm demonstrado a eficiência da macrófita *L.minor* na remoção de contaminantes, em particular de metais. Na tabela 3 estão sintetizados estudos sobre o potencial de remoção pela *L.minor*.

Tabela 3- Compilação de estudos anteriores sobre o potencial de bioacumulação de metais pela espécie *Lemna minor*.

| Elemento(s) | Condições | Resultados (taxas de remoção) | Observações | Referência |
|-------------|--|--|--|---------------------------------------|
| Pb | Duração: 21 dias. Concentração: 5,0 mg/L Nota: Utilização de 3 tipos de biomassa (virgem (BV), exposta (BE) e não viável (BNV)). | (BV) Pb [5,0 mg/L]= 90% (BE) Pb [5,0 mg/L]= 80% (BNV) Pb [5,0 mg/L]= 75% | A maioria da remoção (65%-75%) ocorreu na primeira semana para os 3 tipos de biomassa. Após este período a taxa de remoção decresceu. | (Rahmani & Sternberg, 1999) |
| Pb, Ni | Duração: 8 dias. Concentrações: Pb=5,0 e 10,0 mg/L, Ni=2,5 e 5,0 mg/L | Pb [5,0 mg/L]= 69% Pb [10,0 mg/L]=83% Ni [2,5 mg/L]= 80% Ni[5,0 mg/L]=87% | Constatou-se que a <i>L. minor</i> remove em maior percentagem quando o metal é adicionado em concentrações mais altas. A remoção ocorre muito rapidamente para todos os casos, cerca de 50 a 90% de remoção nas primeiras 24h. | (Axtell, Sternberg, & Claussen, 2003) |
| As | Duração: 21 dias. Concentração: 0,15 mg/L. Temperatura=25°C e Humidade=70%. | As[0,15 mg/L]= 140 ± 30 mg As/ ha d. | Ocorreu redução de biomassa sob as condições de humidade e temperatura, as quais influenciaram negativamente a taxa de crescimento; observou-se uma diminuição acentuada no controle de tratamento (sem As). As concentrações mais baixas de As na água observaram-se no 14º dia, havendo posteriormente libertação de As para a água, como consequência da morte do tecido. | (Alvarado et al., 2008) |

| | | | | |
|----|--|---|--|-----------------------------|
| Tl | Duração: 14 dias. Concentrações: 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 μM . | Após 7 dias de exposição: FBC [0,2 μM]= 624 FBC [0,5 μM]=363 FBC [1,0 μM]= 521 FBC [2,0 μM]= 546 | Após 14 dias de exposição, 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 mM, observaram-se as seguintes reduções de taxas de crescimento de 21,1%, 39,4%, 66% e 83,1%. A fase tóxica inicial é crucial para a aclimação e sobrevivência da planta, isso explica o prolongamento da fase lag. | (Babić et al., 2009) |
| Cu | Duração: 72h Concentrações: 25; 50;100 μM Nota: Exposição de 3 tipos de plantas diferentes, <i>L.minor</i> (EC1) e <i>Spirodela polyrrhiz</i> (SP), recolhidas perto da mina e um ecótipo de <i>L. minor</i> (EC2), retiradas de uma lagoa não contaminada. | Cu[25 μM]= 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS EC2 Cu[>50 μM]= 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS EC1/SP | Há um limiar de 400 g g^{-1} PS acima do qual se observaram impactos nocivos nos pigmentos fotossintéticos em todas as espécies. Os resultados combinados do metabolismo antioxidante e bioacumulação mostram que existe maior tolerância de cobre das espécies recolhidas perto da mina, as quais desenvolvem mecanismos de proteção para limitar a absorção de metal. | (Kanoun-Boulé et al., 2009) |
| Pb | Duração: 7 dias Concentrações: 0,1-10,0 mg L^{-1} Temperatura: 15-35 ° C pH=4,5-8,0 | Melhores taxas de remoção: Pb[10 mg L^{-1}]= 3,599 mg g^{-1} quando pH=4,5. Pb[10 mg L^{-1}]= 8,622 mg g^{-1} quando T=30 ° C e pH 5,0; | Os autores defendem que devido às raízes curtas de <i>L.minor</i> , as plantas podem não ter alcançado os iões de chumbo precipitados na parte inferior, sugerindo assim o uso de diferentes plantas com diferentes para alcançar uma maior eficiência. | (Uysal & Taner, 2009) |

| | | | | |
|---------------|--|--|--|---|
| Ni,Pb,Mn,Cu | Duração: 10 dias. Concentrações: Cu=3,24 mg/L Pb= 6,79 mg/L Ni =4,4 mg/L Mn=20,2 mg/L | Cu=58%; Ni=68%; Pb=62%. Mn=76% quando recirculação=30 L/h. Cu=23%; Ni=62%; Pb=53%. Mn=42% quando recirculação=0 L/h. | Os resultados indicam que de uma forma geral, quanto mais elevada for a circulação maior será a remoção de metais, com exceção do Mn, onde a melhor eficiência (77%) se registou quando o nível de circulação era de 20L/h. | (Yilmaz & Akbulut, 2011) |
| Hg,Pb | Duração: 4 e 7 dias. Concentrações: [Hg]=0,1 - 0,8 mg/L [Pb]=2; 5,5; 10 mg/L Nota: Os metais foram testados isoladamente e posteriormente numa mistura. | Os FBC mais elevados, registaram-se sempre com [Hg]=0,1 mg/L. FBC[Pb=2 mg/L]= 3482 FBC[Pb=5,5 mg/L]= 1572 FBC[Pb=10 mg/L]= 835 | O FBC diminuiu com o aumento da toxicidade em ambos os metais, quando testados isoladamente o valor máximo registou-se quando a concentração em ambos foi de 0,1 mg/L. Sendo que os FBC foram 5800 e 1700 para o Pb e Hg respetivamente. | (Dirilgen, 2011) |
| Cd,Cr,Cu e Zn | Duração: 21 dias. Concentrações/Condições do teste: (1) [Cd]=0,005; [Cr]=1,5; [Cu]=0,1 e [Zn]=1,25 mg/L, com fotoperíodo=16h. (2) duplicaram-se as concentrações relativamente à experiência 1; (3) Dobro das concentrações da experiência 1 e alteração do período de luz para um regime de 24 h. | Cr=94% independentemente da taxa de carregamento de metais e regime de luz; Zn=70%, com FP=18h decrescendo para 28% quando houve adição de metais, contudo quando FP=24h a eficiência foi de 79%. O Pb, Cd e Cu apresentaram padrões relativamente semelhantes, com taxas de remoção de: Pb=36%; Cd=33% e Cu=27%. | A eficiência de remoção aumentou para 80% em condições com luz contínua, sob luz de 24 h. Ordem de remoção nas diferentes experiências. (1) Cr > Zn > Pb > Cd > Cu; (2) Cr > Zn = Pb > Cd = Cu; (3) Cr > Zn > Pb > Cu > Cd; | (Sekomo, Rousseau, Saleh, & Lens, 2012) |

| | | | | |
|-------------|---|---|---|---|
| Cd,Pb,Zn,Cu | Duração: 7 dias. Concentrações: (0; 1×10^{-6} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-4} M). Nota: O estudo foi realizado com 3 macrófitas. | Os melhores FBC: Cu[10^{-6} M]=383068 Zn[10^{-6} M]=562307 Cd[10^{-6} M]=13991 Pb[10^{-6} M]=1084 | <i>L.minor</i> acumulou uma maior concentração de Cd em comparação com <i>Elodea canadensis</i> e <i>Leptodictyum riparium</i> . Concentrações de Zn e Cd: folha superior de superfície<mesófila< superfície mais baixa<caule Pb: mesófila<folha superior de superfície<superfície mais baixa< caule Cu: Não apresentou diferenças significativas. | (Basile et al., 2012) |
| Cd | Duração: 22 dias. Concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3 mg/L | Cd [0,5 mg/L]=77,07 (\pm 1,92)%, Cd [1,0 mg/L]=70,63 (\pm 0,47)%, Cd [1,5 mg/L]=67,56 (\pm 3,42)%, Cd [2,0 mg/L]=60,25 (\pm 0,80)%, Cd [2,5 mg/L]=49,73 (\pm 1,89)%, Cd [3,0 mg/L]=40,69 (\pm 1,71)% | A acumulação máxima de Cd foi de 4734,56 mg/kg quando a 2mg/L de concentração inicial. | (Chaudhuri, Majumder, Misra, & Bandyopadhyay, 2014) |
| As | Duração: 22 dias. Concentrações:0,5; 1,0 e 2,0 mg/L. | A remoção máxima registou-se no 15º dia As[0,5 mg/L]>70% . | O FBC mostra que <i>L. minor</i> é hiper-acumuladora de As na concentração inicial de 0,5 mg/L, FBC= 1454,2. | (Goswami, Majumder, Misra, & Bandyopadhyay, 2014) |

| | | | | |
|-------|---|--|--|----------------------------|
| | | | Em concentrações mais elevadas de 1,0 e 2,0 mg / L, houve amarelecimento e retração de frondes com redução de biomassa. | |
| Fe | Duração: 21 dias, com amostragens no 7º, 14º e 21º dia. Concentrações: [Fe-Ponto 2]= 17,79 mg/L [Fe-Ponto 3]= 22,60 mg/L | Valores de FBC: Ponto 2: 1102,88 ± 138,52 (dia 7); 460,58 ± 113,56 (dia 14); 300,97 ± 87,26 (dia 21); Ponto 3: 802,5 ± 7,43 (dia 7); 451,78 ± 23,64 (dia 14); 30,77 ± 84,5 (dia 21); | A bioacumulação de Fe ocorreu principalmente durante os primeiros 7 dias havendo uma diminuição progressiva das plantas expostas durante os dias 14 e 21. | (Teixeira et al., 2014) |
| B | Duração: 7 dias Concentração= 370,0 ± 10 ppb | <i>L.minor</i> =11,11% <i>L.gibba</i> =28,95%. | Relativamente à <i>L.minor</i> : [P] aumentou; [Ca] diminuiu após o 6º dia; [K] e [Mg] diminuíram até ao sexto dia sofrendo um aumento posteriormente. Se a planta é exposta a uma quantidade elevada de K, é necessário adicionar B para prevenir a diminuição da produtividade. P causa aumento da acumulação de B em concentrações mais elevadas. | (Tatar & Öbek, 2014) |
| Ni,Cr | Duração: 22 dias Concentrações: [Ni]=3,05; 3,98 e 4,9 mg/L. [Cr]=1,91, 2,98 e 4,2 mg/L Notas: As concentrações de Ni na água foram | Melhores percentagens de remoção ocorreram no 22º dia de ensaio. Ni [3,05 mg/L]=87,33% Cr [4,2 mg/L]=49,79% | Verificou-se para ambos os metais, uma melhor remoção com o decorrer do ensaio, independentemente da concentração testada. | (Goswami & Majumder, 2015) |

| | | | | |
|------------------|---|---|---|---|
| | analisadas no 2º,5º,15º e 22º dia. | | | |
| Cu, Pb, Zn, e As | Duração: 8 dias. Concentrações: [Cu]=67 µg/L [Pb]=7,5 µg/L [Zn]= 7230 µg/L [As]= 96 µg/L | [Cu] =147 mais Cu que a água do ribeiro. Pb: 7051 mais Pb que a água do ribeiro. Zn: 1156 mais Zn que a água do ribeiro. As: 3941 mais As que a água do ribeiro. | A acumulação de Zn foi linearmente crescente. Relativamente ao Pb e As a máxima acumulação registou-se no 2º e 8º dias respetivamente. O máximo de acumulação de Cu registou-se no 2º dia de ensaio. A espécie <i>L.gibba</i> mostrou melhores resultados na remoção de metais. A sequência de metais acumulados pelas duas espécies foi: As>Pb>Zn>Cu. | (Sasmaz, Arslan Topal, Obek, & Sasmaz, 2015) |
| Cu,Zn,Cd | Duração: 6 dias. Concentrações: [Cu]=4,10 mg/L [Zn]=4,30 mg/L [Cd]= 7,30 mg/L | Concentração de metais (mg/g peso fresco) Cu=0,381±0,021 Zn=0,557±0,009 Cd=1,251±0,041 Cd(isoladamente)=1,560±0,021 | Observou-se alteração na coloração das folhas, ficando amareladas ao longo do ensaio. No tratamento (Cu + Zn + Cd) houve diminuição no teor de proteína na <i>L.minor</i> . | (Török, Gulyás, Szalai, Kocsy, & Majdik, 2015) |
| Cd,Cu,Pb,Ni | Duração: 31 dias. Concentrações: <u>Efluentes industriais:</u> [Cd]=0,038 mg/L; [Cu]=0,062 mg/L; [Cr]=Abaixo do limite de deteção; [Pb]= 0,608 mg/L; [Ni]=0,0591 mg/L <u>Efluentes municipais:</u> | Após 31 dias. <u>Efluentes industriais:</u> Ni(99%)>Pb(97,4%)> Cd (94,7%)>Cu(94,5%) <u>Efluentes municipais:</u> Cd(94,3%)>Cu(92,2%)>Pb(89%)>Ni (84,2%). | O FBC para todos os elementos foi inferior a 1000, no entanto, o FBC máximo foi de Cu = (558) e Pb = (523,1), no tratamento do efluente industrial, estes resultados revelam que a planta tem uma acumulação moderada de ambos os metais, nestas condições. | (Bokhari, Ahmad, Mahmood-Ul-Hassan, & Mohammad, 2016) |

| | | | | |
|-----|--|---|--|-------------------------|
| | [Cd]=0,054 mg/L; [Cu]=0,032 mg/L; [Cr]=Abaixo do limite de deteção; [Pb]= 0,419 mg/L; [Ni]=0,051mg/L | | | |
| N,P | Duração: 72h, com amostragem ao fim de 24h. Concentrações: 5mg N/L e 0,5 mg P/L. | O stress salino elevado (NaCl 100 mM) induziu a <i>Lemna</i> a libertar N e P e resultou em eficiências de remoção negativas. | Quanto mais elevado for o stress salino com maior período de cultivo maiores são as lesões na planta e maior será a inibição da remoção de N e P, verificando-se uma maior remoção passadas 72h. Os resultados indicam que a <i>L. minor</i> deve ser usada para remover N e P da água com salinidades abaixo de 75 mM NaCl | (Liu, Dai, & Sun, 2017) |

Considerando os estudos compilados na tabela 3, importa reter alguns aspetos fundamentais sobre os ensaios de fitorremediação analisados:

- Axtell et al., (2003); Rahmani & Sternberg, (1999); Sasmaz et al., (2015); Teixeira, Vieira, Marques, & Pereira, (2014) concluíram que a remoção ocorreu nos primeiros dias de ensaio, contrariamente a Goswami et al., (2014) que obtiveram um máximo de remoção de As no décimo quinto dia de ensaio, assim como no ensaio realizado por Alvarado et al., (2008), em que apesar de a concentração de As testada ser bastante mais baixa, verificou-se um máximo de remoção no 14º dia de ensaio.
- Observou-se uma maior eficiência de remoção de Cd, Hg e Pb quando testados isoladamente (Dirilgen, 2011; Török et al., 2015).
- Considera-se que a *L.minor* foi moderadamente hiperacumuladora de Ti, independentemente das concentrações testadas por Babić et al., (2009). No estudo levado a cabo por Bokhari et al., (2016), todos os FBC encontraram-se abaixo de 1000 mg/kg, sendo que os valores mais elevados se registaram no último dia de ensaio.
- As macrófitas revelaram-se hiperacumuladoras quando testadas numa mistura de [Hg]=0,1 mg/L e [Pb]=2 mg/L, assim como [Hg]=0,1 mg/L e [Pb]=5,5 mg/L (Dirilgen, 2011), assim como no 7º dia do ensaio, quando a concentração inicial de Fe no meio era de 17,79 mg/L (Teixeira et al., 2014). Revelou-se hiperacumuladora de As, quando testada numa concentração de 0,5 mg/L (Goswami et al., 2014).
- Observaram-se algumas relações entre o FBC, a concentração dos metais e a durabilidade do ensaio, Teixeira et al., (2014) observaram uma redução dos FBC após o 7º dia de ensaio (máximo de remoção atingida); já Dirilgen, (2011) relacionou o aumento da toxicidade com a diminuição dos FBC.
- Conclui-se também que alguns fatores contribuíram para a eficiência de remoção, nomeadamente, condições de luz contínua, existência de circulação (30 L/h), assim como valores de pH mais baixos (4,5-5,0) (Sekomo et al., 2012; Uysal & Taner, 2009; Yilmaz & Akbulut, 2011).

1.4 Casos de estudo

Neste trabalho foram considerados dois casos de estudo distintos que envolvem problemáticas ambientais atuais.

1.4.1 Caso de estudo 1#: Cinzas de incêndios florestais

As florestas mediterrânicas são bastante vulneráveis a incêndios florestais, em que os verões secos e longos contribuem drasticamente para o aumento do seu risco, devido à combinação das condições meteorológicas, dos agentes de ignição e das condições de combustão. De tal forma, que é perceptível que a ocorrência de incêndios provoca inúmeros impactos socioeconómicos e ambientais (Bugalho & Pessanha, 2009; Stolle, Chomitz, Lambin, & Tomich, 2003). A respeito do ambiente, destacam-se efeitos nas seguintes componentes: ar, solo, água e biota, estando estes efeitos relacionados com as características próprias dos incêndios, tais como a sua frequência, gravidade e intensidade (Setterfield et al., 2010).

Os metais existem naturalmente no solo e vegetação e após o incêndio ocorre a mobilização e transporte dos metais que ficam acumulados na matriz cinza. Através de processos de escorrência superficial, a cinza é arrastada para os sistemas aquáticos adjacentes e consequentemente ocorre a entrada dos metais que lhe estão associados. Este fenómeno tem impacto nos ecossistemas aquáticos (incluindo os sistemas aquáticos a jusante da área ardida), onde consequentemente se registam sérios e complexos problemas sobre a qualidade da água, com efeitos sobre a biota aquática (Censi et al., 2006; Nunes et al., 2017; Silva et al., 2015; Zhou et al., 2008).

1.4.1.1 Impactos dos incêndios florestais no biota aquático

Estudos realizados realçam a gravidade dos impactos ambientais para a biodiversidade, reforçando o facto de que o lançamento de cinzas para o ambiente tem efeitos drásticos nas diversas comunidades. Vários autores relatam que existe um aumento das espécies após a ocorrência do incêndio, como cianobactérias (Charette & Prepas, 2003), diatomáceas sendo que o aumento da biomassa das diatomáceas vem acompanhado de uma alteração da sua composição. Este aumento deve-se ao facto de haver entrada de nutrientes nas águas, os quais estimulam o crescimento de algumas espécies, salientando também que o excesso de nutrientes poderá provocar eutrofização, devido a um aumento da proporção de N:P (Planas, Desrosiers, Groulx, Paquet, & Carignan, 2000; Ranalli, 2004).

Segundo Minshall (2003), as espécies oportunistas, particularmente aquelas bem-adaptadas para a dispersão através do vento e com elevado sucesso reprodutivo, como por exemplo

Chironomidae e *B. bicaudatus*, assim como espécies tolerantes, com amplas capacidades de adaptação a diversos habitats e requisitos de alimentos herbívoros- detritívoros como exemplo, *Z. columbiana*, parecem ser especialmente bem-adaptadas às condições após o incêndio, salienta também o facto de muitos géneros de *Ephemeroptera*, nomeadamente *Baetis* serem sensíveis à redução da qualidade da água.

De acordo com Rinne (1996) imediatamente após a ocorrência de um incêndio, as águas contaminadas com lamas tóxicas e cinzas são fatais para uma elevada percentagem de salmonídeos, a minoria sobrevivente pode tornar-se fisiologicamente stressada. A população de macroinvertebrados é também fortemente reduzida devida à má qualidade da água. Todavia os danos provocados dependem de alguns fatores como: a intensidade do incêndio, a frequência e duração dos fluxos durante as monções de Verão e da permanência dos riachos a jusante para os quais os peixes se podem deslocar.

Pilliod, Bury, Hyde, Pearl, & Corn, (2003) demonstraram que as populações de anfíbios são identicamente afetadas por incêndios, muitas das espécies de anfíbios que se reproduzem em águas frias têm uma baixa taxa de fecundidade comparativamente às espécies que se reproduzem em águas quentes, têm um ciclo de vida longo e, portanto, podem ter um tempo de resposta de recuperação após os incêndios maior. No que respeita às Salamandras, os autores denotaram que o seu tamanho médio na área queimada diminuiu durante os 4 anos após o incêndio.

Nomeadamente a estudos ecotoxicológicos, os primeiros estudos foram desenvolvidos por Campos et al., (2012) e Silva et al., (2015), os quais revelaram que compostos libertados ou mobilizados por incêndios, como é o caso dos HAP e metais, podem provocar toxicidade significativa para algumas espécies, nomeadamente, a alga *Raphidocelis subcapitata*, na macrófita *L. minor* e a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*, induzindo inibições no crescimento nas plantas ou luminescência das bactérias.

Posteriormente, Nunes et al., (2017) utilizaram biomarcadores com vista a encontrar sinais de alerta precoce de toxicidade desencadeada pela exposição do peixe *Gambusia holbrooki* a amostras aquosas de escoamento superficial e de água recolhidas de uma área queimada, o estudo revelou a existência de modificações pró-oxidantes, contrapondo, não se verificaram efeitos por parte dos metais e HAP a nível neurotóxico.

Face a estas considerações é perceptível que os incêndios são uma forte ameaça para os sistemas aquáticos sendo fulcral uma correta avaliação dos impactos dos incêndios nos sistemas aquáticos dada a sua potencialidade para provocarem alterações no funcionamento e estrutura dos

ecossistemas. Considerando que as águas superfícies e subterrâneas são muitas vezes usadas para consumo humano, acresce ainda um potencial risco de saúde pública.

1.4.2 Caso de Estudo 2#: Efluente da indústria de pasta e papel (EIPP)

A indústria de pasta e papel é considerada uma das maiores indústrias a nível mundial, tendo simultaneamente elevado impacto no ambiente devido aos elevados consumos de água, produção de resíduos e emissão de gases (Ali & Sreekrishnan, 2001; Lacorte et al., 2003; V. Sharma, Grag, & Arora, 2014; Toczyłowska-Mamińska, 2017).

Segundo Toczyłowska-Mamińska (2017) a produção de papel apresenta uma tendência crescente, nos próximos anos, que será traduzida, conseqüentemente, num aumento de consumo de água e energia. De acordo com a Associação da Indústria Papeleira (CELPA), a produção de papel e cartão em Portugal, em 2016, foi de 2.300,2 mil toneladas, tendo-se verificado um acréscimo de 3,6%, relativamente ao ano de 2015.

Neste sentido, a poluição das massas de água requer especial atenção dado os elevados volumes de água consumidos e gerados para a produção de papel. Contudo, o seu consumo pode ser minimizado através da recirculação de água no sistema, método que permite reduzir as descargas de água e, subseqüentemente, os impactos nas massas de água (Ashrafi, Yerushalmi, & Haghighat, 2015).

1.4.2.1 Características do efluente gerado pela indústria de pasta e papel

O esquema representado na figura 2 representa, sucintamente, o processo e os poluentes resultantes das diferentes etapas de produção de pasta e papel. Destaca-se também que as propriedades do efluente dependem de alguns fatores tais como: escala de produção, matéria-prima utilizada e das tecnologias aplicadas ao longo do processo, recirculação interna do efluente e dos caudais de água utilizados em cada processo (Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Tikku, Kumar, Sawhney, Singh, & Kumar, 2007).

Mais de 250 substâncias foram identificadas no efluente gerado pela indústria de pasta e papel como responsáveis por causarem danos severos nos ecossistemas aquáticos, caso não sejam tratadas devidamente, uma vez que contém elevado teor de matéria orgânica, caracterizada pela baixa biodegradabilidade, alta coloração, elevadas concentrações de AOX e toxicidade elevada, assim como elevada CBO, CQO, sólidos suspensos (principalmente fibras), ácidos gordos, taninos, ácidos resínicos e lignina (Ali & Sreekrishnan, 2001; Ashrafi et al., 2015; Yeber, Rodríguez, Freer, Durán, & Mansilla, 2000).

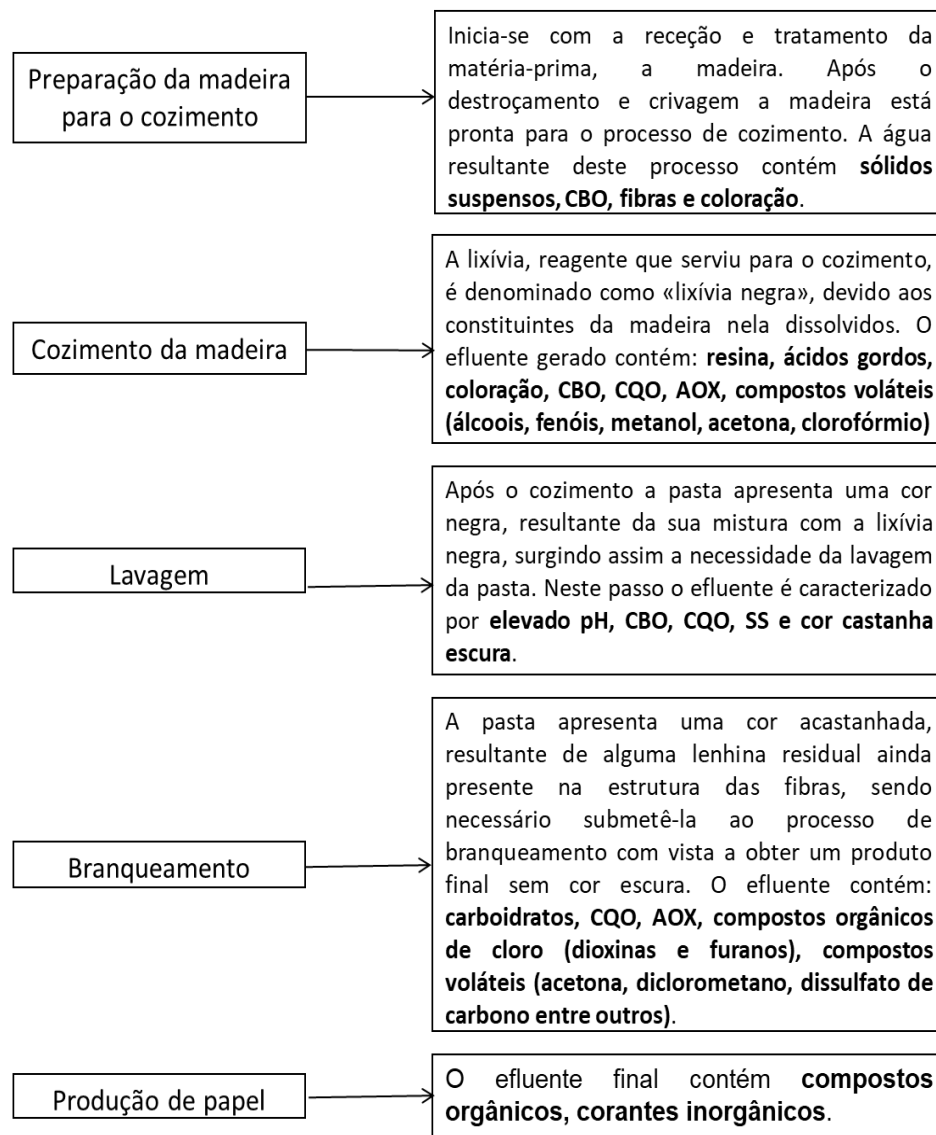


Figura 2- Processo e poluentes resultantes das diferentes etapas de produção de pasta e papel. Fonte: (Pokhrel & Viraraghavan, 2004).

O efluente, assim como as lamas derivadas da indústria de pasta e papel, contém metais como o Fe, Cu, Cr, Cd, Mn, Ni e Pb, que surgem no processo como impurezas dos químicos utilizados, águas de lavagem e da madeira utilizada (Chandra & Singh, 2012; McCrady, 1996).

Os processos convencionais utilizados para reduzir estes parâmetros são, muito frequentemente, ineficientes na remoção completa dos compostos orgânicos tóxicos, acrescendo também o facto de possuírem efeitos nocivos para o ambiente devido à produção de lamas, à libertação de gases com efeito de estufa e ao consumo excessivo de energia (Ashrafi et al., 2015; Kahmark & Unwin, 1998; Toczyłowska-Mamińska, 2017).

Outro aspeto importante de salientar, em relação à indústria de pasta e papel, é que esta é limitada em termos de macronutrientes, pelo que os tratamentos convencionais requerem, por norma, a adição de N e P, habitualmente insuficientes para satisfazerem os requisitos de crescimento bacteriano.

A figura 3 representa a evolução das quantidades de azoto e fósforo total presente no efluente final das empresas associadas à CELPA (Associação de Indústria Papeleira).

A CELPA estima que em 2016, 63% dos efluentes líquidos foram descarregados no oceano, 23% em estuários e 14% em rios e albufeiras. Neste sentido, é imprescindível referir a importância da salinidade, nomeadamente na disponibilidade de metais, a elevada salinidade provoca a formação de complexos de cloretos de metais (Greger, 1999).

Antes de qualquer procedimento com vista à redução destes compostos é necessário conhecer as fontes e o seu comportamento ao longo do sistema (Slade, Ellis, vanden Heuvel, & Stuthridge, 2004). Devido a uma legislação cada vez mais rigorosa, nomeadamente no que se refere às descargas de águas e tendo em conta que a maioria dos tratamentos secundários são extremamente dispendiosos é imperativo implementar ações de remediação com vista a reduzir os poluentes e os seus impactos (Ali & Sreekrishnan, 2001).

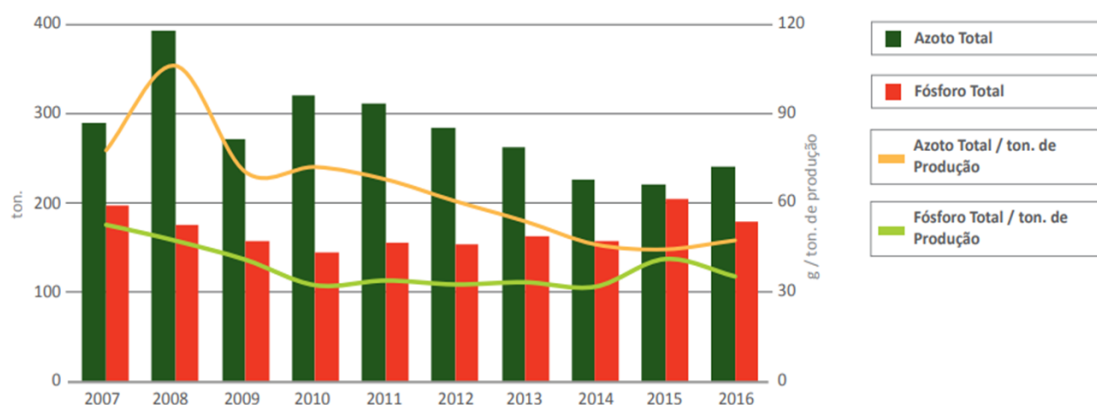


Figura 3- Evolução histórica das concentrações de N e P nos efluentes das indústrias de pasta e papel entre o período 2007- 2016. Fonte: (CELPA).

1.4.2.2 Efeitos do efluente de pasta e papel no ambiente

Os impactos ambientais dos efluentes derivados da indústria de pasta e papel têm vindo a ser reconhecidos ao longo dos anos, desde a promoção do crescimento de algas, impactos térmicos, formação de escórias, problemas de coloração. Assim como impactos na biota aquática, existindo uma ampla evidência sobre os efeitos tóxicos causados nos organismos como por exemplo, stress respiratório, atividades mistas de oxigenase, toxicidade e mutagenicidade em diversas espécies de peixes assim como a presença de poluentes tóxicos como compostos organoclorados os quais provocam perturbações endócrinas, crescimento retardado, disfunção da tiroide, redução de fertilidade em peixes e invertebrados aquáticos (Karels, Soimasuo, & Oikari, 1999; Munkittrick, McMaster, McCarthy, Servos, & Van Der Kraak, 1998; Owens, Swanson, & Birkholz, 1994; Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Yen, Oanh, Reutergardh, Wise, & Lan, 1996). A redução dos efeitos inibitórios ou tóxicos dos efluentes das fábricas de pasta e papel, nas algas, pode resultar num aumento da produtividade primária devido ao enriquecimento de nutrientes (Podemski & Culp, 1996).

1.5 Objetivos e motivação

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o potencial de fitorremediação da macrófita *L. minor* em dois cenários de contaminação distintos: extratos de cinzas de incêndios e efluente de indústrias de pasta e papel. Em termos de objetivos específicos, podem-se definir três importantes objetivos: i) caracterização química das matrizes em estudo: extratos de cinzas de incêndios florestais e efluente de indústria de pasta e papel; ii) determinação da sensibilidade/tolerância da macrófita *L. minor* quando exposta às matrizes em estudo através do uso de ferramentas ecotoxicológicas, com vista à definição de concentrações a usar nos estudos de bioconcentração; e iii) avaliar a eficiência de remoção dos contaminantes pela macrófita.

1.6 Estrutura

O presente documento de dissertação foi organizado em cinco capítulos. O primeiro capítulo é um capítulo introdutório, onde são abordadas temáticas como: a poluição aquática, a contaminação dos sistemas aquáticos por metais, os principais métodos de remoção, com ênfase na fitorremediação. Neste capítulo é também feita uma revisão abrangente da literatura sobre a capacidade de remoção de metais pela espécie *L. minor*. Posteriormente são também apresentados os casos de estudo- Cinzas de incêndios e Efluente da indústria de pasta e papel. No capítulo II apresentam-se os materiais e métodos utilizados ao longo do estudo; no capítulo III realiza-se a

análise e discussão dos resultados obtidos; e por último, no capítulo IV são apresentadas as considerações finais.

2. Material e métodos

2.2 Recolha de amostras preservação e preparação

2.2.1 Caso de estudo #1- Cinzas de incêndios florestais

As cinzas foram recolhidas imediatamente após o incêndio florestal numa área queimada de pinheiro, localizada no centro-norte de Portugal, perto da freguesia de Talhadas, Sever do Vouga, distrito de Aveiro (N 40º 39 '54' ' ; W 8º 21' 47 ' '). O incêndio deflagrou a julho de 2013, afetando 815 hectares predominantemente cobertos por eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*). O incêndio foi classificado como de alta severidade, de acordo com a metodologia descrita por Keeley, 2009; Shakesby & Doerr, (2006).

Com o intuito de simular o transporte de cinzas para os sistemas aquáticos por escorrência superficial que ocorre no pós-fogo foram efetuados extratos aquosos de cinza (EAC) segundo os procedimentos adotados por Silva et al., (2015). Dados de campo mostram que o valor de SST não excede 5 g/L, considerando desta forma o valor máximo testado no ensaio ecotoxicológico (100%).

Para a preparação dos EAC, os recipientes foram envolvidos em papel de alumínio para evitar eventos de foto degradação e foram colocados num agitador durante 2 horas a 200 rpm (Silva et al., 2015). Os EAC foram conservados a 4°C até à realização dos ensaios e análise.

2.2.2 Caso de estudo #2- EIPP

Procedeu-se à recolha do EIPP na condução de transporte do efluente industrial à entrada do sistema multimunicipal de Saneamento da Ria de Aveiro (SIMRIA). A recolha foi realizada no dia 12 de abril de 2018. O efluente foi conservado a 4°C até à realização dos ensaios e análise.

2.3 Cultura e manutenção de *Lemna minor*

As culturas de *L. minor* foram mantidas em laboratório seguindo os procedimentos descritos em OECD (2006). As culturas foram estabelecidas em aquários de vidro de 4L com meio de cultura Steinberg e mantidas a uma temperatura de 24°C±2 e um fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro. A mudança das culturas foi realizada uma a duas vezes por semana.

2.4 Ensaios ecotoxicológicos

Os testes ecotoxicológicos permitem avaliar a resposta de organismos face à exposição a substâncias tóxicas, permitindo desta forma o estabelecimento de relações dose (concentração)-resposta assim como relações causa-efeito. Sendo por isso considerados uma ferramenta indispensável à correta avaliação dos impactos de tóxicos no ambiente (Silva, Pereira, Gonçalves, Keizer, & Abrantes, 2016).

Os ensaios ecotoxicológicos de crescimento de *L.minor* foram efetuados seguindo os procedimentos descritos em OECD (2006). Quer o EAC, quer o efluente de pasta e papel foram testados em várias concentrações: 100%, 75%, 50%, 25% e 12,5%, usando o meio APW como diluente. Foi ainda testado um controlo (0%) com meio APW (Naylor, Maltby, & Calow, 1989). Por cada concentração e controlo foram consideradas três réplicas.

Com o intuito de tornar mais realista a experiência foi usado o meio APW, tanto para as diluições como para a preparação do EAC, dado que este meio é menos rico em termos de nutrientes ao invés do meio Steinberg, que é por norma utilizado em ensaios ecotoxicológicos por ser considerado o meio ótimo de crescimento. Outro problema associado ao meio Steinberg é o facto de este conter ligandos e um agente quelante - EDTA, podendo intrefereir na absorção de metais pela macrófita.

O bioensaio teve uma duração de sete dias e foi realizado com luz contínua e a uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, em frascos de urina, tapados com parafilme perfurado. Cada frasco continha 100 mL de amostra e três colónias de *L. minor* num total de 9 frondes por frasco. Ao longo do ensaio não foi efetuada renovação de meio.

No decorrer do teste, os frascos foram reposicionados aleatoriamente para reduzir a variação espacial induzida relativamente à temperatura e intensidade luminosa tal como recomendado pelo método da (OECD, 2006).

Após o término do teste, foram contabilizados o número de frondes e determinado o peso seco de cada réplica, e calculadas posteriormente as taxas de crescimento (equação 1), e inibição da taxa de crescimento (equação 2).

Equação 1

$$TC = \frac{\ln(Nf) - \ln(Ni)}{t}$$

Em que, TC corresponde à taxa de crescimento específico, N_i o peso seco inicial, N_f corresponde ao peso seco final, e t é o período de duração do ensaio, que neste caso foi de 7 dias.

Equação 2

$$\%I = \frac{TC_c - TC_T}{TC_c} \times 100$$

Em que %I é a percentagem de inibição da taxa de crescimento específico, TC_c é o valor médio da taxa de crescimento no controlo e TC_T é o valor médio da taxa de crescimento em cada concentração testada.

2.5 Ensaio de bioacumulação

Após o ensaio ecotoxicológico, o qual permitiu definir curvas dose-resposta, e determinar qual a concentração mais viável a utilizar, realizou-se o ensaio de bioacumulação, com uma duração de 15 dias, para avaliar a capacidade de bioacumulação da espécie *L. minor* e consequentemente o seu papel como biofiltro na remoção de metais, nomeadamente Zn, Fe e Mn, de Extratos aquoso de cinzas (EAC) e de efluente da indústria pasta e papel (apenas foi estudada a remoção de Fe e Mn).

Para o ensaio de bioacumulação foram considerados dois tratamentos, um com plantas e outro sem plantas (Figura 4). O tratamento sem plantas funcionou como controlo e teve como objetivo garantir que não ocorreram perdas por volatilização ou perdas através da absorção às paredes dos recipientes. O ensaio foi realizado em caixas de plástico com a dimensão de 24,8/17,5/6 cm com 1,5L de volume de amostra líquida. No tratamento com plantas o teste foi iniciado com cerca de 300 colónias de *L. minor*, o correspondente a cerca de 2,45 g em peso fresco e 0,1 g em peso seco. Com base na literatura definiu-se uma duração de ensaio de 15 dias, retirando-se amostras nos dias: 0, 3, 5, 7, 12 e 15. Por cada dia de amostragem foram consideradas três réplicas (Figura 4).



Figura 4- Desenho experimental

2.6 Parâmetros analisados ao longo do ensaio

Após cada tempo de ensaio, procedeu-se à análise de pH, CE, CBO, CQO e nutrientes (NH_3 , NO_2^- , NO_3^- , N e P), seguindo os procedimentos descritos no Standard methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2017).

O pH e CE foram determinados usando o aparelho HI 2550.

Na medição de CQO foi utilizado o método colorimétrico (5220 D), e para a determinação do CBO foi usado o método eletrométrico. Os nutrientes foram quantificados através do método colorimétrico.

Para quantificar os metais foi necessário proceder a uma digestão ácida, cujo objetivo foi destruir a matriz orgânica e/ou extrair os íons metálicos ligados a complexos inorgânicos e orgânicos (Stafilov & Karadjova, 2009). A determinação dos metais foi realizada por espectrometria de absorção atômica (APHA, 2017)

Relativamente ao meio de cultura, procedeu-se a uma acidificação com HNO_3 e HCl , seguindo-se um aquecimento a 100°C e filtragem. As amostras foram conservadas a 4°C até à leitura (APHA, 2017).

Para a determinação de metais nas plantas, as macrófitas foram lavadas cuidadosamente com água destilada e secas a uma temperatura de 70°C até ao seu peso ser constante, as quais foram posteriormente moídas e reduzidas a pó. No seguimento colocou-se 100 mg de material seco nas bombas de Teflon, adicionando 2 ml da mistura de ácidos $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ (7:1 v/v) (HNO_3 65% pro analysis; HClO_4 70% pro analysis). Seguidamente foram colocadas na estufa a 100°C , durante 3h, após o arrefecimento, os extratos contidos nas bombas foram filtrados para tubos de ensaio e diluídos com água destilada até perfazerem 10 ml, sendo armazenados a 4°C até à análise (Vinagre, Cabral, & Caçador, 2008).

Os métodos de cálculo utilizados para o estudo foram a percentagem de eficiência (equação 4) e o fator de bioconcentração (FBC) (equação 5), respetivamente segundo os autores (Tanhan, Kruatrachue, Pokethitiyook, & Chaiyarat, 2007; Zayed, Gowthaman, & Terry, 1998).

Equação 4

$$\% \text{ eficiência} = \frac{C0 - C1}{C0} \times 100$$

Em que, C0 representa a concentração inicial no meio (mg/L), e a C1 corresponde à concentração final no meio (mg/L).

Equação 5

$$FBC = \frac{\text{Concentração de metal na planta } (\mu\text{g g}^{-1})}{\text{Concentração de metal no meio } (\text{mg L}^{-1})}$$

2.7 Análise de dados

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados através do software *SigmaPlot for Windows Version 14*. Com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas das concentrações entre os diferentes tratamentos considerados, assim como a existência de diferenças significativas ao longo do tempo no EAC ou efluente, procedeu-se à análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*). Para avaliar a existência de diferenças significativas das concentrações na planta ao longo do ensaio procedeu-se à análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Caso de estudo 1#: Cinzas de incêndios florestais

3.1.1. Caracterização físico-química dos EAC

Pela análise da figura 5a, pode-se verificar que o pH foi praticamente constante durante todo o ensaio, estando situado entre 8,5 e 8,8. Estes valores encontram-se dentro dos valores de tolerância da *L.minor* (3,5-10,5) (Rezania et al., 2016). Contudo, ao longo do período de ensaio observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabela 4). O pH é considerado um dos fatores que mais afeta a toxicidade assim como a disponibilidade de metais para a biota, todavia esta relação é alvo de controvérsia entre alguns autores (Franklin, Stauber, Markich, & Lim, 2000). Baker, Mayfield, Inniss, & Wong, (1983) concluíram que o aumento da toxicidade ocorre com a diminuição do pH devido à predominância de íões metálicos livres. Por outro lado, alguns estudos mostraram que a toxicidade diminuiu no caso do Cd, Cu e Zn, com a diminuição do pH, sendo justificada pela competição com o H^+ (Campbel & Stokes, 1985; Peterson, Healey, & Wagemann, 1984). Ainda segundo Vesely & Majer, (1996), as concentrações de metais aumentam com a diminuição do pH, para a maioria dos metais em estudo. Não foram registadas alterações significativas entre o tratamento com plantas e o tratamento sem plantas ($p = 0,352$) (Tabela 4), contudo o valor do pH poderá ter influenciado as concentrações de metais acumuladas pelas plantas. Uysal & Taner, (2009) obtiveram taxas de remoção mais elevadas quando o pH no meio era mais baixo (4,5 ao invés de 8).

No que respeita à CE no tratamento sem plantas não foram observadas diferenças significativas na CE ao longo do ensaio (Figura 5b). Pelo contrário, para o tratamento com plantas observou-se uma redução significativa da CE, mais acentuada no décimo quinto dia. De facto, comparando os tratamentos, observaram-se diferenças significativas entre eles ($p < 0,001$) (Tabela 4). Como será discutido posteriormente, ocorreu diminuição de alguns dos sais solubilizados na água, podendo desta forma justificar a diminuição da CE (Thirumalini & Joseph, 2009). Verificou-se também que existem diferenças significativas ao longo do tempo ($p < 0,001$) (Tabela 4).

É perceptível que ocorreram reduções significativas de CBO no tratamento com plantas ao longo do ensaio ($p < 0,001$) (Tabela 4) (Figura 5c). Contudo e dada a impossibilidade de estudar o comportamento da CBO ao longo do tempo, para o tratamento sem plantas, apenas se comparou o valor final com o inicial, assim como o valor da CBO no último dia de ensaio para ambos os tratamentos, concluindo que não existem diferenças significativas de CBO entre tratamentos ($p = 0,347$) (Tabela 4). Uma possível justificação, poderá ser devido ao facto da cobertura vegetal

não ter sido suficientemente extensa para existirem condições anóxicas suficientes, as quais provocariam uma variação de oxigénio mais baixa. Assim como pelo facto de existirem evidências entre a toxicidade de alguns elementos como: Al, Co, Ni, Cu, Zn, Pb e Hg e a a inibição de CBO (Mittal & Ratra, 2000).

Notou-se um aumento de CQO entre o terceiro e o quinto dia de ensaio em ambos os tratamentos (Figura 5d). Foram assim observadas diferenças significativas, ao longo do ensaio ($p<0,001$) (Tabela 4). Igualmente, comparando os tratamentos com e sem planta, também foram observadas diferenças significativas ($p=0,008$) (Tabela 4), verificando-se que a presença da *L. minor* levou a uma redução do CQO.

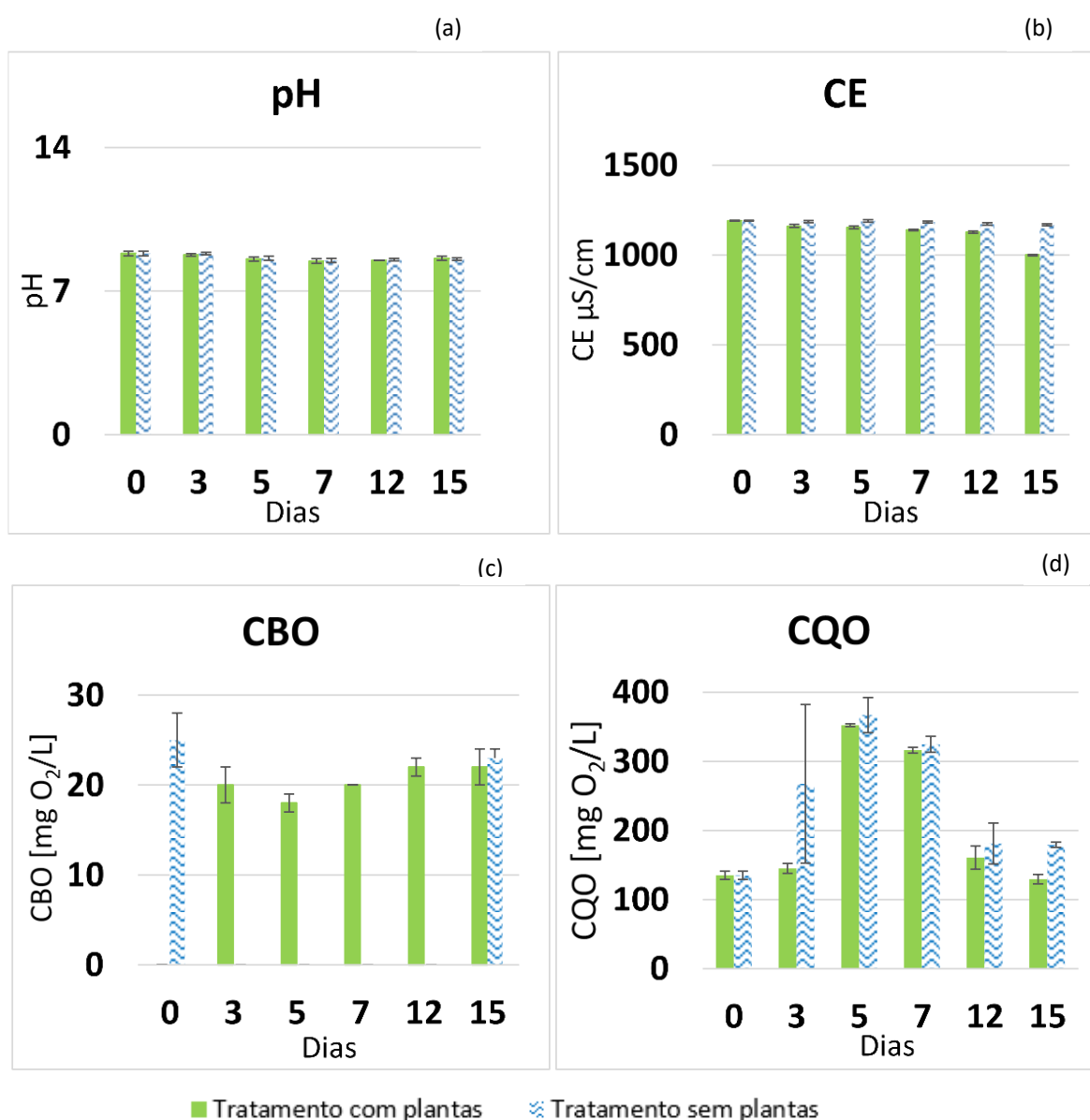


Figura 5-Valores de pH (a), CE (b), CBO (c) e CQO (d) ao longo do ensaio na matriz EAC

Tabela 4- Resultados da análise de variância (ANOVA) de duas vias para os parâmetros analisados no EAC

| | | F | P |
|-----------------------|------------|---------|--------|
| pH | Tratamento | 0,897 | 0,352 |
| | Tempo | 16,601 | <0,001 |
| CE | Tratamento | 37,543 | <0,001 |
| | Tempo | 7,993 | <0,001 |
| CBO | Tratamento | 8,128 | 0,347 |
| | Tempo | 7,231 | <0,001 |
| CQO | Tratamento | 8,306 | 0,008 |
| | Tempo | 29,062 | <0,001 |
| NH₃ | Tratamento | 63,578 | <0,001 |
| | Tempo | 8,102 | <0,001 |
| P | Tratamento | 11,719 | 0,002 |
| | Tempo | 305,211 | <0,01 |
| Fe | Tratamento | 0,173 | 0,680 |
| | Tempo | 1,679 | 0,175 |
| Zn | Tratamento | 0,0764 | 0,784 |
| | Tempo | 1,224 | 0,326 |
| Mn | Tratamento | 0,186 | 0,978 |
| | Tempo | 1,019 | 0,431 |

Considera-se que os nutrientes N, P e K são os principais requeridos pelas plantas, sendo que a sua limitação induz inibições de crescimento e ocorrência de clorose ((UNIDO) & (IFDC), 1998; Coors, Kuckelkorn, Hammers-Wirtz, & Strauss, 2006; Mkandawire & Dudel, 2007). De acordo com Landolt, (1986) para um crescimento ótimo da espécie *L. minor*, o intervalo de valores recomendados de N e P localizam-se entre 2,8 a 350 mg/L N e 0,43 a 10 mg/L P. Realça-se que os valores ótimos de N considerados pelo autor são apresentados sem qualquer distinção química. As concentrações de NO₂⁻, NO₃⁻ e N não estão representadas devido aos seus valores estarem abaixo do limite de detecção do aparelho, sendo deste modo considerados negligenciáveis.

Verificou-se existirem diferenças significativas das concentrações de NH₃ (Figura 6a) entre tratamentos assim como ao longo do ensaio (p<0,001 e p=0,006, respetivamente) (Tabela 4). Comparando os dois tratamentos, verifica-se que o tratamento com a planta apresentou no geral valores inferiores de NH₃. Verificou-se ainda que o valor inicial da NH₃ foi muito abaixo do valor estabelecido para o crescimento ótimo (2,8 a 350 mg/L N). Lemnaceae está entre o grupo de plantas que pode utilizar tanto a NH₃ como NO₃⁻ como fontes de N, sendo a NH₃ a sua fonte prioritária. Considerando estes dois aspetos e sendo o N um importante nutriente requerido pela planta, verifica-se que o seu crescimento/desenvolvimento pode ter sido afetado pela limitação de N,

podendo desta forma ter influenciado a eficiência de remoção de metais da planta (Landolt, 1986; Porath & Pollock, 1982).

No que respeita aos valores de P (Figura 6b), verificou-se a existência de diferenças significativas das concentrações de P entre tratamentos ($p=0,002$) (Tabela 4), assim como se observaram diferenças ao longo do ensaio ($p<0,001$) (Tabela 4). Não obstante, os valores de P no tratamento com plantas apresentaram-se inferiores comparativamente com o tratamento sem plantas. Também os valores de P se encontram abaixo dos valores recomendados para o crescimento ótimo da macrófita (0,43 a 10 mg/L P). Contudo, seria expectável uma redução de P ao longo do ensaio, o que não se verificou. Um aspeto importante a ter em consideração é a relação entre a toxicidade do Zn e a absorção de P, que de certo modo pode explicar a manutenção dos valores de P ao longo do ensaio (Broadley, White, Hammond, Zelko, & Lux, 2007; Rao, Shivashankara, & Laxman, 2016).

Sabe-se que as espécies do género *Lemnaceae* são capazes de sobreviver em concentrações muito baixas de nutrientes durante dias ou semanas, contudo o crescimento só é possível quando o meio de cultura contém nutrientes nas concentrações requeridas pela planta, o que não vai de encontro ao presente caso de estudo (Coors et al., 2006). Deste modo, a opção por um meio de cultura que se aproximasse mais de condições reais e, portanto, mais pobre em nutrientes, pode ter influenciado os resultados do ensaio de bioacumulação.

Conclui-se, que o stress provocado pela limitação de nutrientes, pode ter contribuído para as baixas taxas de remoção de metais.

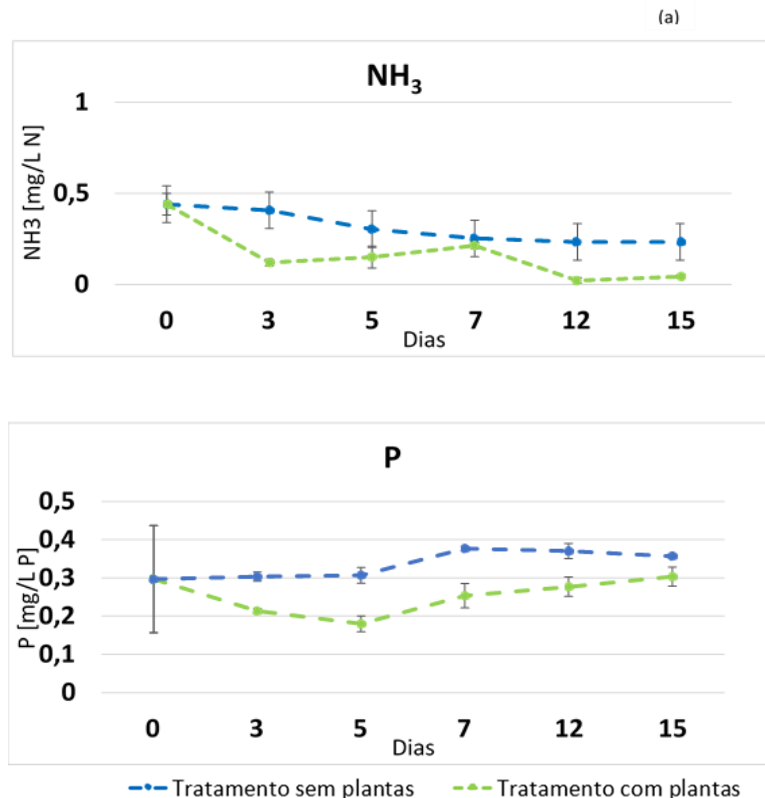


Figura 6- Valores de NH₃ (a) e P (b) ao longo do ensaio na matriz EAC

3.1.2. Ensaio ecotoxicológico preliminar

Após o ensaio ecotoxicológico verificou-se que o EAC não provocou toxicidade em *L. minor*, optando-se deste modo por realizar o ensaio de bioacumulação utilizando o extrato sem diluições. Os resultados de ecotoxicidade observados neste estudo estão de acordo com o observado por Campos et al., (2012) e Silva et al., (2015), que verificaram que o crescimento da macrófita é inibido na presença de EAC em concentrações mais elevadas.

3.1.3. Ensaio de bioacumulação

Durante o ensaio de bioacumulação, observou-se a partir do sétimo dia de ensaio, clorose em alguns frondes, aumento do tamanho das raízes, assim como diminuição do tamanho dos frondes. O aumento do tamanho das raízes está relacionado com a falta de nutrientes no meio, sendo este um mecanismo da planta para alcançar os nutrientes necessários, contudo (Uysal & Taner, 2009) constataram no seu trabalho que devido à pequena estrutura das raízes da *Lemna*, a planta não conseguiu alcançar os iões de Pb precipitados, sugerindo a utilização de plantas com diferentes

fisiologias (emergentes, submergentes e com diferentes tipos de raízes), de modo a obter uma maior eficiência de remoção.

A redução e atraso do crescimento assim como a clorose são sintomas de toxicidade do Zn. A clorose, pode surgir em parte, de uma deficiência de Fe através de reduções na síntese de clorofila e degradação de cloroplastos, interferindo assim na absorção de P, Mg e Mn (Broadley et al., 2007; Rao et al., 2016).

No sétimo dia de ensaio, verificou-se uma cor vermelho-arroxeadado na maioria das folhas, sendo este um outro efeito típico da toxicidade do Zn, estando associada à deficiência de P (Lee, Choi, & Pak, 1996).

Pela análise da figura 7, verifica-se que em ambos os tratamentos, com e sem planta, as concentrações de Fe foram similares, não se observando diferenças significativas entre tratamentos ($p=0,680$) (Tabela 4). Do mesmo, também não foram observadas diferenças significativas na concentração de Fe entre diferentes tempos de ensaio não estatisticamente significativas ($p=0,175$) (Tabela 4).

Bharti & Kumar Banerjee, (2012) mostraram no seu estudo que a quantidade de metais removidos, incluindo o Fe, foi maior que a quantidade de metais acumulados no tecido vegetal, verificando-se desta forma que a sua remoção não ocorreu somente devido à bioacumulação pela planta.

Pela análise da figura 7, verifica-se que até ao quinto dia de ensaio não ocorreu qualquer acumulação. Contudo, ao sétimo dia, a concentração de Fe duplicou, atingindo um máximo de cerca de 100 ug/g. A partir do sétimo dia observou-se, um decréscimo até ao final do ensaio. Esta variação na acumulação observada ao longo dos quinze dias de exposição poderá estar relacionada com a toxicidade da matriz, já que as elevadas concentrações de Pb nas cinzas poderão ter provocado um efeito tóxico, o qual não permitiu que a planta mantivesse as concentrações internas, assim como poderá ter influenciado na absorção de Fe por parte da macrófita ($p=0,057$) (Tabela 5). De facto, o Pb reduz a absorção e transporte de Ca, Fe, Mg, Mn, P e Zn (Patra, Bhowmik, Bandopadhyay, & Sharma, 2004), podendo deste modo exercer toxicidade sobre *L. minor* e influenciar a acumulação de Fe. Estes resultados corroboram os estudos realizado por Teixeira et al., (2014), que verificaram igualmente que o máximo de acumulação de Fe pela planta ocorreu no sétimo dia de ensaio, constatando também um decréscimo a partir desse dia. Os autores justificam este decréscimo, possivelmente, pelo facto da planta ter atingido o máximo de saturação após os primeiros dias. A suportar esta explicação está ainda a concentração de Fe no EAC (Figura 7), que a partir do sétimo dia aumentou e que pode ser explicada pela reposição de Fe no meio. Segundo (Drost et al., 2007),

pode ocorrer excreção passiva ou ativa do metal pela planta, justificando-se assim as variações observadas nas concentrações de Fe observadas.

Pela análise da tabela 6 observam-se valores de FBC muito baixos, assim como percentagens de eficiência baixas a moderadas (entre os 7% e os 42%). Além dos fatores referidos anteriormente, é importante considerar que o Fe poderia estar numa forma não acumulável pela planta. Deste modo, conclui-se que nas presentes condições teste a *L. minor* não foi hiperacumuladora de Fe.

Tabela 5- Resultados da análise de variância (ANOVA) de uma via para os parâmetros analisados em *Lemna minor*.

| | F | P |
|----|-------|-------|
| Fe | 3,299 | 0,057 |
| Zn | 4,080 | 0,021 |
| Mn | 8,550 | 0,01 |

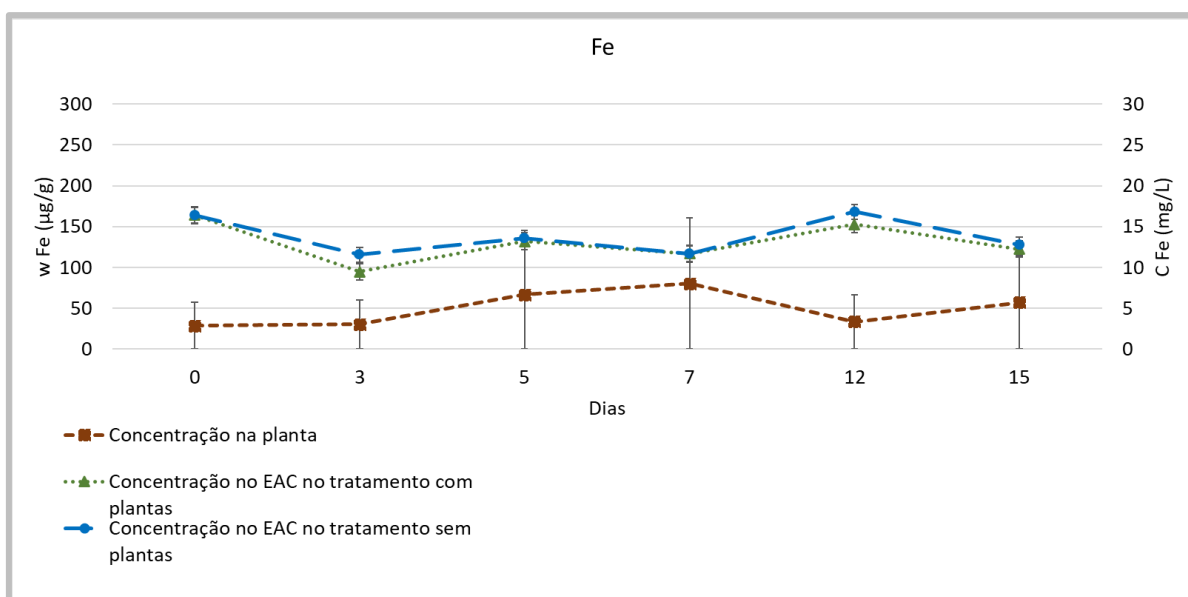


Figura 7-Concentração de Fe no EAC e na planta

Tabela 6- Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Fe ao longo do período de ensaio

| | FBC | Percentagem de eficiência(%) |
|--------|-----|------------------------------|
| dia 3 | 3 | 42 |
| dia 5 | 5 | 20 |
| dia 7 | 7 | 29 |
| dia 12 | 2 | 7 |
| dia 15 | 5 | 25 |

Como já referido anteriormente, o Zn é um micronutriente necessário para os sistemas biológicos, passando a ser considerado tóxico perante uma determinada concentração. O Zn é um constituinte ou cofator de várias enzimas, estando envolvido na síntese de proteínas, bem como no metabolismo de carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios, podendo também formar complexos com DNA e RNA afetando sua estabilidade (Radić, Babić, Škobić, Roje, & Pevalek-Kozlina, 2010).

Segundo Welch & Shuman, (1995) para o crescimento ideal da maioria das espécies de plantas, a concentração do íon Zn no meio deve estar compreendida entre 65×10^{-11} e 65×10^{-10} mg L⁻¹. Deste modo, a concentração inicial do meio encontrava-se acima do valor recomendado, podendo assim ter exercido alguma toxicidade sobre a planta.

Öbek, (2009), verificou no seu ensaio que a acumulação de Cu, Zn e Pb ocorreu apenas nos primeiros dias do ensaio com *Lemna gibba*, havendo posteriormente uma redução, possivelmente, devido ao seu nível de saturação. O mesmo foi verificado no presente estudo, notando-se uma redução de Zn na planta a partir do sétimo dia de ensaio, contudo as concentrações de Zn ao longo do ensaio não são consideradas significativamente significativas ($p=0,021$) (Tabela 5) (Figura 8). Similarmente ao Fe, as concentrações de Zn nos EAC foram muito similares entre tratamentos, e ao longo do tempo, não se observando assim diferenças significativas ($p=0,784$ e $p=0,326$) (Tabela 4). Pela análise conjunta das concentrações de Zn no meio e na planta, é perceptível que, quando a planta atinge o nível de saturação (sétimo dia), a concentração no meio aumenta, registando-se inclusive concentrações mais elevadas no tratamento com plantas do que no tratamento sem plantas a partir do sétimo dia, processo este já anteriormente referido. Pela análise da tabela 7 observam-se percentagens de eficiência negativas, o que eventualmente pode ser devido à limitação de nutrientes anteriormente reportada, ou até mesmo à toxicidade induzida pelo Pb ou Zn, e que induziu as plantas a libertarem Zn para o meio.

Um aspeto essencial para a análise de acumulação de metais é o facto dos metais tóxicos competirem com os sistemas de transporte de absorção de micronutrientes, devido ao facto de utilizarem a mesma membrana transportadora utilizada para a absorção de Ca²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺. Tendo-se como exemplo uma mistura de metais, observou-se que a remoção de Zn e Cd ficaram comprometidas, os resultados obtidos indicaram uma forte competição por proteínas de transporte, dado que são absorvidos para as células da planta através de canais/transportadores de Fe, Ca e Zn de baixa especificidade, tendo assim prioridade por alguns elementos ao invés de outros (Clemens, 2006; Nazar et al., 2012). Esta poderá ser também uma explicação para a baixa remoção de Zn pela planta, dando assim prioridade a outros elementos. Esta explicação é também confirmada por Vidaković-Cifrek et al., (2015) que concluíram que os valores dos FBC calculados

para Cd, Zn e Cu foram menores nas plantas expostas a tratamentos combinados comparativamente aos tratamentos com um único metal, confirmando a competição dos metais pelos mecanismos de captação.

De acordo com vários autores, existe uma relação entre a concentração inicial e a percentagem remoção/acumulação de Zn na planta. Sekomo et al., (2012) obtiveram percentagens de remoção de 70% e 80% quando as concentrações iniciais de Zn no elutriado foram de 1,25mg/L e 2,5 mg/L, respetivamente. Jain, Vasudevan, & Jha, (1989) testaram no seu trabalho diferentes concentrações de Zn fornecido como nitrato de zinco ($Zn(NO_3)_2$) (1;2;4 e 8 mg/L), concluindo que após quatorze dias de exposição, o Zn acumulado nos tecidos das plantas aumentou com o aumento da concentração. Deste modo, uma eventual justificação para a baixa eficiência de remoção de Zn, poderá ser pela baixa concentração inicial no meio.

Deste modo, atendendo às condições do presente ensaio, verificou-se um baixo desempenho da macrófita na acumulação de Zn.

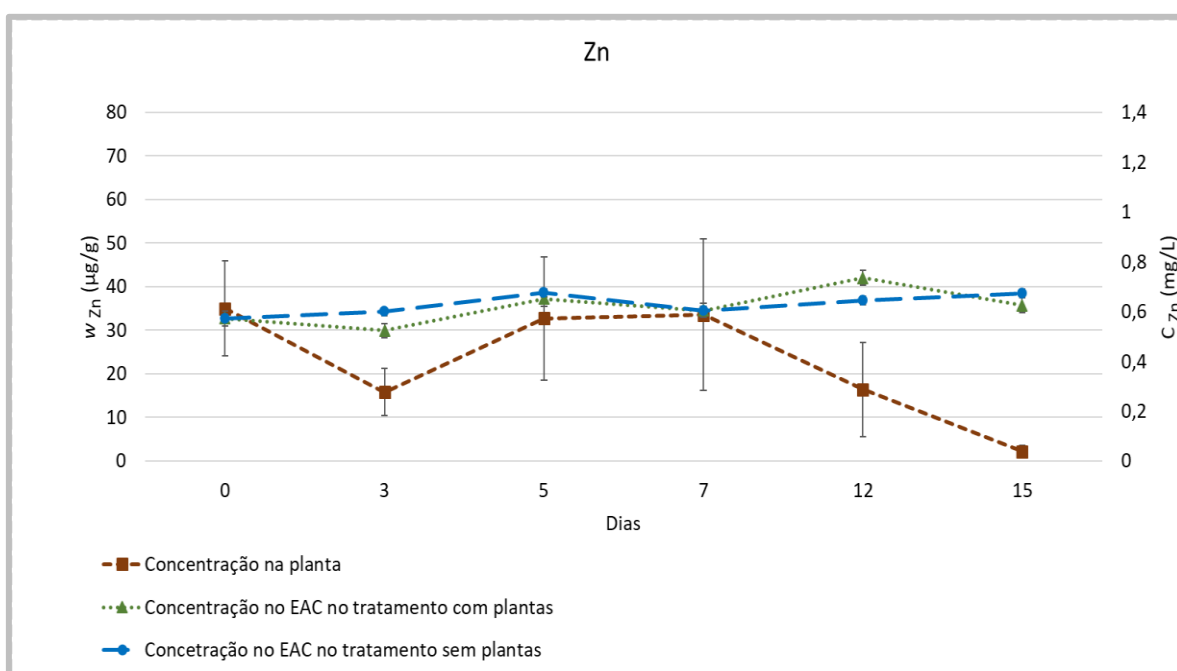


Figura 8-Concentração de Zn no EAC e na planta

Tabela 7- Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Zn ao longo do período de ensaio

| | FBC | Percentagem de eficiência (%) |
|--------|-----|-------------------------------|
| Dia 3 | 30 | 9 |
| Dia 5 | 50 | -13 |
| Dia 7 | 56 | -6 |
| Dia 12 | 22 | -28 |
| Dia 15 | 4 | -9 |

Pela análise da figura 9, é perceptível que a concentração de Mn no EAC, em ambos os tratamentos foram constantes ao longo do tempo, não existindo diferenças significativas, quer entre tratamentos, quer ao longo do tempo ($p=0,978$ e $p=0,431$, respetivamente) (Tabela 4). Adicionalmente, verificou-se que a concentração de Mn no tratamento com plantas atinge um plateau até ao final do ensaio.

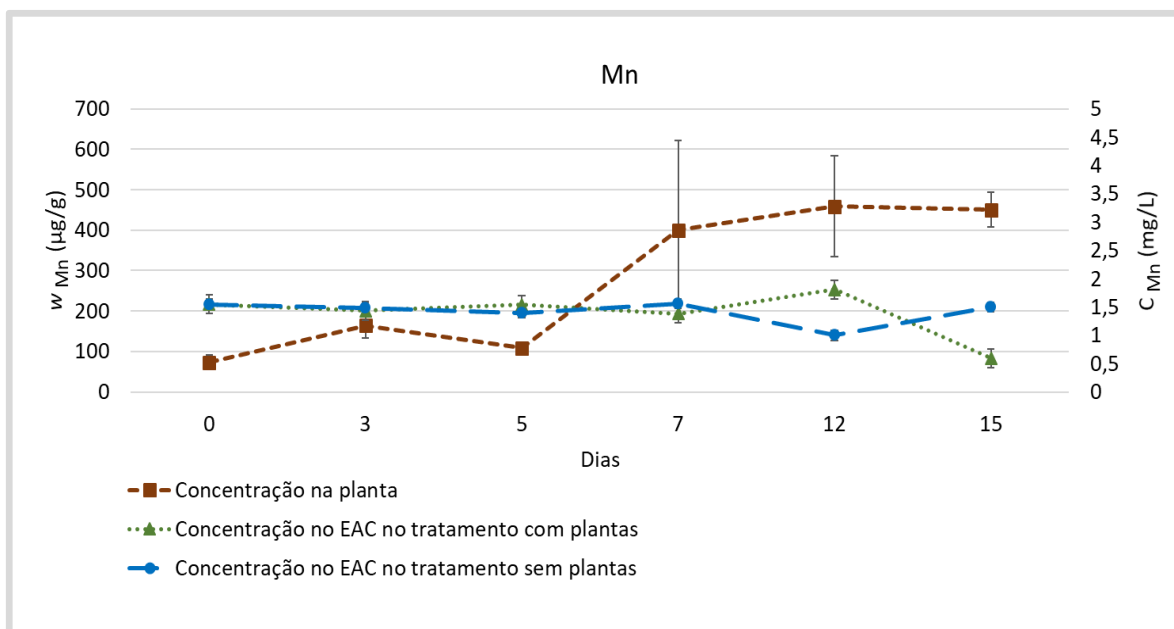


Figura 9-Concentração de Mn no EAC e na planta

A baixa remoção de Mn poderá estar relacionada com alguns fatores, nomeadamente a toxicidade de Zn, já anteriormente referida, e que poderá ter tido interferência na remoção de Mn, como mencionado por Broadley et al., (2007). Outra possível justificação para a baixa remoção de Mn, estará eventualmente relacionada com as concentrações de Pb presentes nas cinzas, sendo que este elemento poderá ter reduzido o efeito de absorção do Mn (Patra et al., 2004). Deste modo, o baixo desempenho é comprovado pelos baixos valores de FBC (Tabela 8), assim como pelas baixas percentagens de eficiência, registando-se inclusive no décimo segundo dia de ensaio, uma eficiência negativa, devido à concentração no décimo segundo dia ser superior à concentração

inicial. Esta eficiência negativa, poderá eventualmente dever-se a um mecanismo de excreção ativo ou passivo por parte da planta ou devido a alguns dos fatores já acima referidos. Não obstante, *L. minor*, é considerada como moderadamente hiperacumuladora a partir do sétimo dia de ensaio (Zayed et al., 1998).

Tabela 8 - Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Mn ao longo do período de ensaio

| | FBC | Percentagem de eficiência (%) |
|--------|-----|-------------------------------|
| dia 3 | 115 | 8 |
| dia 5 | 71 | 0,8 |
| dia 7 | 290 | 11 |
| dia 12 | 254 | -17 |
| dia 15 | 758 | 62 |

3.2. Caso de Estudo 2#: EIPP

3.2.1. Caracterização físico-química do EIPP

Analisando os valores de pH (Figura 10a), verificou-se que os mesmos são constantes e encontram-se dentro dos valores ótimos para o crescimento da macrófita (de 3,5 a 10,5) (Rezania et al., 2016) não havendo diferenças de pH significativas entre tratamentos ($p=0,058$) (Tabela 9). Contudo, observaram-se diferenças de pH significativas ao longo do ensaio ($p<0,001$) (Tabela 9). À semelhança do caso de estudo apresentado anteriormente, conjugando a complexidade da matriz com a incoerência dos resultados obtidos em estudos realizados sobre a relação entre a toxicidade e o pH, não é possível concluir se este parâmetro contribuiu para a toxicidade, sem ter em consideração as inúmeras variáveis envolvidas (Baker et al., 1983; Campbel & Stokes, 1985; Peterson et al., 1984).

No que respeita à CE (Figura 10b), esta manteve-se praticamente constante no tratamento sem plantas. Já no tratamento com plantas observou-se uma pequena redução, sendo as diferenças de CE entre tratamentos estatisticamente significativas ($p<0,001$) (Tabela 9). Relativamente aos valores de CE ao longo do ensaio também foram observadas diferenças significativas ($p=0,004$) (Tabela 9).

Em relação à CBO (Figura 10c), observou-se uma redução ao longo do ensaio, com diferenças significativas ($p<0,001$) (Tabela 9), contrariamente às diferenças entre tratamentos, as quais não são estatisticamente significativas ($p=0,109$) (Tabela 9).

Os valores de CQO são considerados estatisticamente significativos entre tratamentos e ao longo do tempo de ensaio ($p=0,046$ e $p<0,001$, respectivamente) (Tabela 9) (Figura 10d).

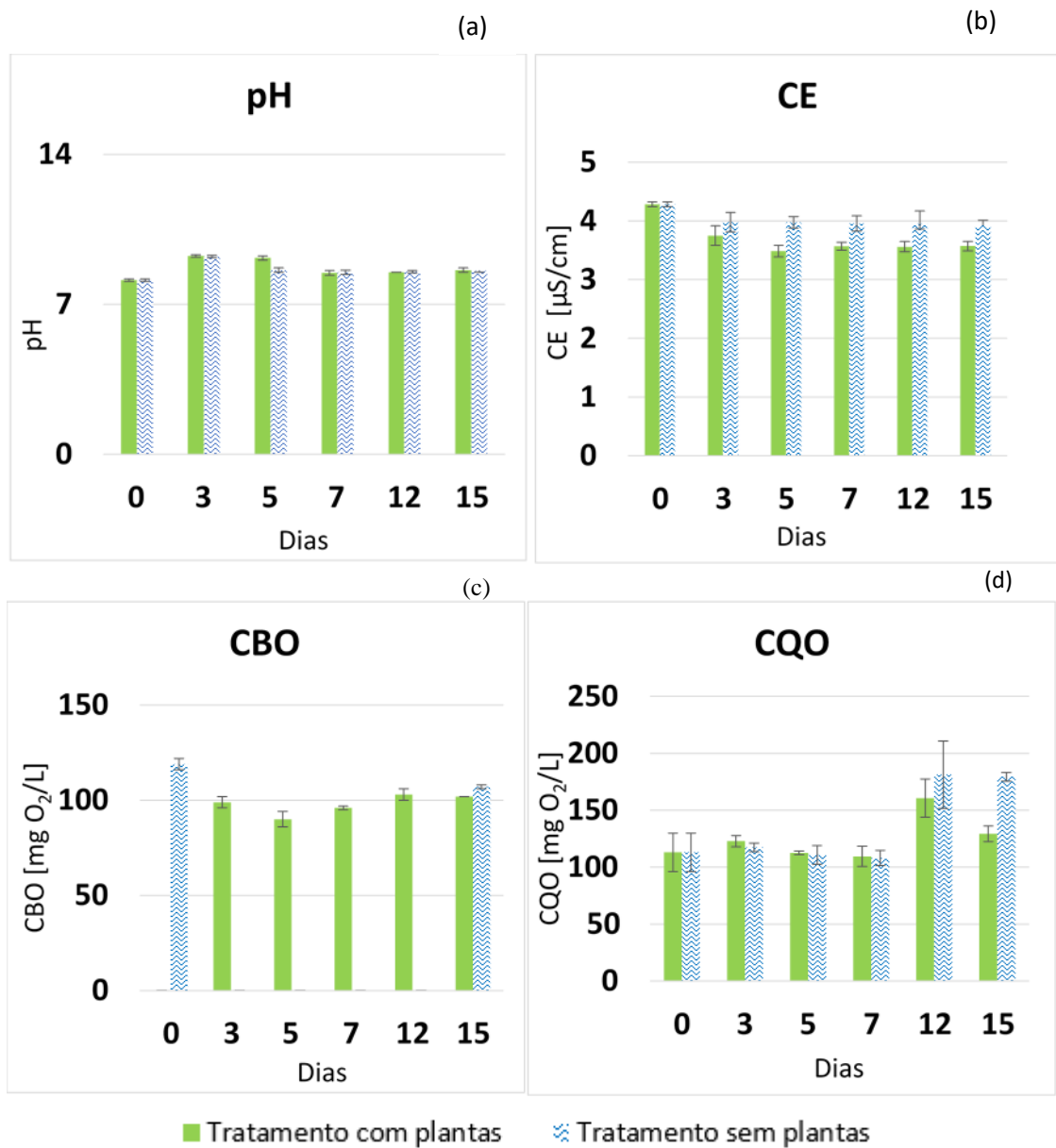


Figura 10-Valores de pH (a), CE (b), CBO (c) e CQO (d) ao longo do ensaio com EIPP

Tabela 9- Resultados da análise de variância (ANOVA) de duas vias para os parâmetros analisados no EIPP

| | | F | P |
|-----------------------|------------|--------|--------|
| pH | Tratamento | 3,922 | 0,058 |
| | Tempo | 26,793 | <0,001 |
| CE | Tratamento | 72,212 | <0,001 |
| | Tempo | 4,675 | 0,004 |
| CBO | Tratamento | 1,359 | 0,347 |
| | Tempo | 10,230 | <0,001 |
| CQO | Tratamento | 4,380 | 0,046 |
| | Tempo | 15,610 | <0,001 |
| NH₃ | Tratamento | 78,484 | <0,001 |
| | Tempo | 4,233 | 0,006 |
| P | Tratamento | 1,277 | 0,269 |
| | Tempo | 5,141 | 0,002 |
| Fe | Tratamento | 0,0515 | 0,822 |
| | Tempo | 6,229 | <0,01 |
| Mn | Tratamento | 92,663 | <0,01 |
| | Tempo | 4,052 | 0,007 |

Os valores obtidos relativos às concentrações de N, NO₃⁻, NO₂⁻ foram excluídos devido aos valores estarem abaixo do limite de detecção.

Os valores iniciais de NH₃ (Figura 11a) não se encontram no limite do intervalo delineado por Landolt, (1986) para o crescimento ótimo da macrófita, contrariamente ao P (Figura 11b).

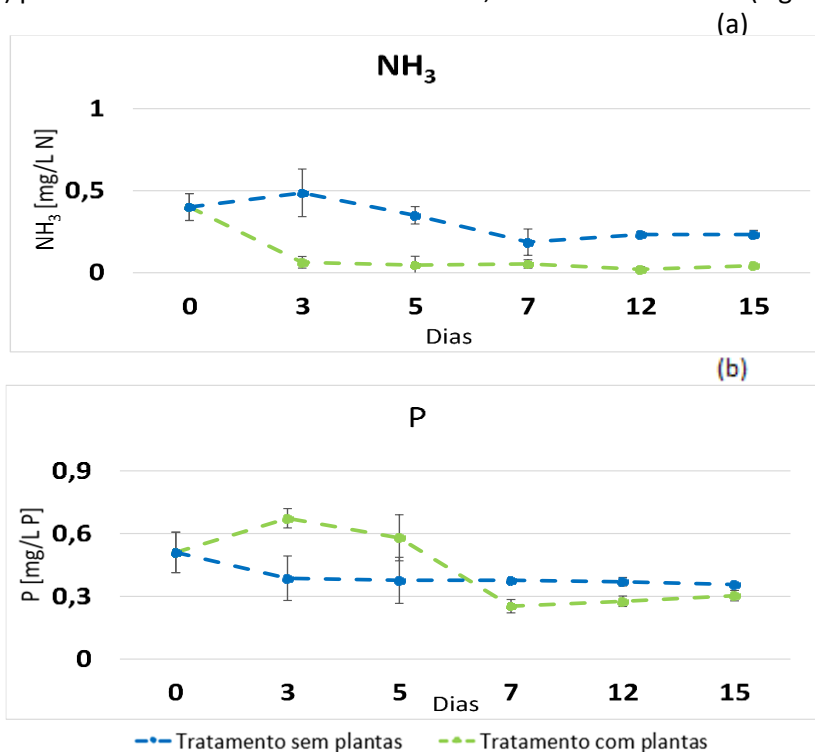


Figura 11- Valores de NH₃(a) e P (b) ao longo do ensaio com EIPP

No que respeita à NH_3 , através da leitura da figura 11a, relativamente ao tratamento com plantas, observou-se um decréscimo entre o início do ensaio e o terceiro dia de ensaio, mantendo-se constante até ao final do ensaio, o que mostra o esgotamento de NH_3 por parte da planta, já que este é um dos nutrientes mais requeridos pela planta. No tratamento sem plantas, apesar das concentrações serem superiores comparativamente ao tratamento com plantas, ocorreu uma diminuição após o terceiro dia. O decréscimo poderá ter sido provocado por perdas de evaporação ou devido ao processo de nitrificação, contudo seria expectável um aumento de nitratos, o que não se verificou.

Pela análise da figura 11b, referente ao comportamento do P, observa-se que as concentrações de P no tratamento com planta apresentaram alguma flutuabilidade, ao contrário do tratamento sem planta, que se manteve relativamente constante. Ainda assim, não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos ($p=0,269$) (Tabela 9). Contudo, registaram-se diferenças de concentrações de P significativas ao longo do tempo ($p=0,002$) (Tabela 9).

3.2.2. Ensaio ecotoxicológico preliminar

Após o ensaio ecotoxicológico verificou-se que o efluente industrial de pasta e papel (EIPP) não provocou toxicidade em *L. minor*, optando-se deste modo por realizar o ensaio de bioacumulação utilizando o efluente sem diluições.

3.2.3. Ensaio de bioacumulação

Em relação à bioacumulação de Fe em *L. minor* (Figura 12), o valor máximo de acumulação pela planta foi registado no quinto dia, contudo a variação das concentrações ao longo do ensaio não foram estatisticamente significativas ($p=0,082$) (Tabela 10). Comparando a dinâmica de bioacumulação da planta com as concentrações no efluente com planta (Figura 12) ao longo dos quinze dias, verificou-se não serem concordantes. A diminuição da concentração de Fe na planta a partir do quinto dia poderá dever-se a alguns fatores, tais como: excreções do metal pela planta; diluição da concentração interna de Fe devido a um aumento da biomassa (crescimento); toxicidade do efluente, o qual não permitiu manter a concentração interna (Drost et al., 2007).

Pela análise da figura 12 verifica-se um decréscimo significativo em ambos os tratamentos ao longo do ensaio ($p<0,001$) (Tabela 9), com perdas de 72% (valores médios durante o ensaio). De igual modo, Mishra & Tripathi, (2008) também obtiveram no seu ensaio perdas no controlo (tratamento sem plantas), contudo essas perdas registaram-se no intervalo de 1,7 a 5,1%, a solução em estudo era uma mistura de Fe, Cu, Zn, Cd e Cr.

Analogamente ao caso de estudo 1, as perdas de Fe podem ter resultado de processos de precipitação, entre outros. Comprando os dois tratamentos, com e sem planta (figura 12), verificou-se uma elevada similaridade, não se registrando assim diferenças significativas entre tratamentos ($p=0,074$) (Tabela 9).

Uma possível deficiência de Fe poderá ter provocado distúrbios nutricionais nas *Lemnas*, sendo a clorose um dos efeitos associados à deficiência de Fe (Broadley et al., 2007; Rao et al., 2016).

Através do cálculo do FBC e da percentagem de eficiência (Tabela 11), conclui-se que a planta, atinge os melhores resultados no décimo segundo dia de ensaio, com um FBC de 1429 e uma percentagem de eficiência de 91%. Contudo, considerando que o tratamento sem planta apresentou uma tendência muito similar ao tratamento com planta, e observando a redução de Fe na planta a partir do quinto dia, não se pode afirmar que a planta tenha exercido a sua função de acumuladora, e seja o fator responsável pela redução da concentração de Fe no EIPP.

Tabela 10- Resultados da análise de variância (ANOVA) de uma via para os parâmetros analisados em *Lemna minor*

| | F | P |
|-----------|--------|--------|
| Fe | 2,977 | 0,074 |
| Mn | 46,363 | <0,001 |

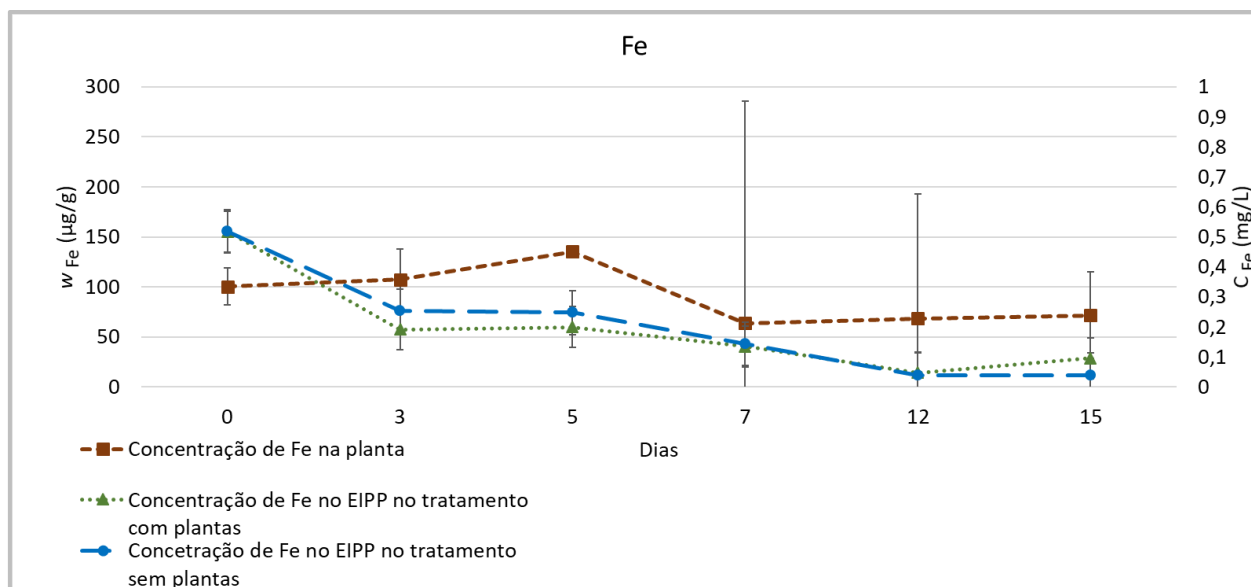


Figura 12-Concentração de Fe no EIPP e na planta

Tabela 11- Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Fe ao longo do período de ensaio

| | FBC | Percentagem de eficiência (%) |
|--------|------------|--------------------------------------|
| dia 3 | 562 | 63 |
| dia 5 | 679 | 62 |
| dia 7 | 469 | 74 |
| dia 12 | 1429 | 91 |
| dia 15 | 748 | 82 |

Relativamente à concentração de Mn na planta (Figura 13) observaram-se diferenças significativas ao longo do ensaio ($p < 0,001$) (Tabela 10). Primeiramente ocorreu um aumento até ao terceiro dia de ensaio, mantendo-se constante até ao quinto dia, a partir do quinto dia nota-se um decréscimo bastante acentuado até ao décimo segundo dia, voltando a aumentar até ao final do ensaio. Primeiramente é importante considerar, que muito embora o ensaio de ecotoxicidade não tenha revelado toxicidade para o crescimento da planta, a exposição foi de apenas sete dias, comparativamente com os quinze dias de ensaio de bioacumulação. Assim, dada a duração do ensaio de bioacumulação, a potencial toxicidade do efluente ao longo do tempo (ver ponto anterior) pode não ter permitido manter as concentrações internas, provocando oscilações ao longo do ensaio.

Por outro lado, é importante considerar que a estabilização, seguida de redução de Mn na planta, pode ter eventualmente ocorrido devido a uma saturação por parte da *Lemna*, provocando consequentemente uma excreção por parte da planta.

Comparando os dois tratamentos, com e sem planta, não foram observadas diferenças significativas. Contudo, verifica-se que na sua generalidade o tratamento com plantas apresentou valores inferiores comparativamente ao tratamento sem plantas.

Pela análise da tabela 12, observam-se valores de FBC superiores a 1000 mg kg^{-1} , concluindo que a macrófita foi hiperacumuladora de Mn (Mkandawire & Dudel, 2007). Em relação às percentagens de eficiência, rondam todas por volta dos 80%, com exceção do quinto dia, onde a percentagem foi negativa. Neste sentido, é possível afirmar que a planta, ainda que de forma inconstante, desempenhou o seu papel de acumuladora de Mn.

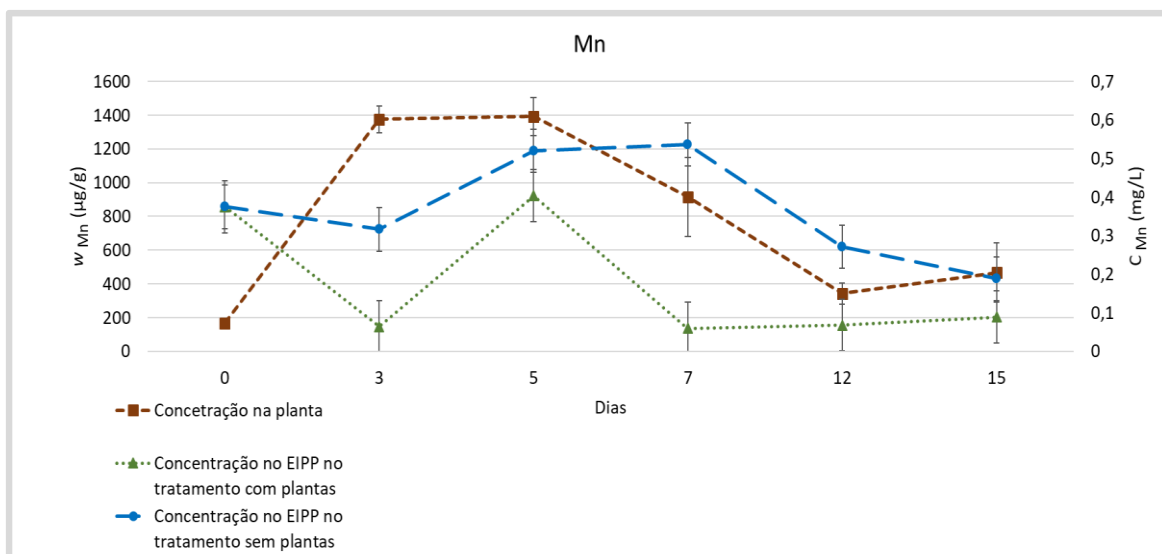


Figura 13-Concentração de Mn no EIPP e na planta

Tabela 12- Fatores bioconcentração e percentagem de eficiência relativos ao Mn ao longo do período de ensaio.

| | FBC | Percentagem de eficiência (%) |
|--------|-------|-------------------------------|
| dia 3 | 21537 | 83 |
| dia 5 | 3446 | -8 |
| dia 7 | 15325 | 84 |
| dia 12 | 5032 | 82 |
| dia 15 | 5264 | 76 |

4. Considerações finais

Existem alguns aspetos comuns em ambos os casos do presente estudo que são importantes de referir e que foram considerados uma dificuldade adjacente da discussão de resultados. Nomeadamente a complexidade das matrizes em estudo, assim como uma possível existência de efeitos sinérgicos resultantes dos diversos compostos orgânicos e inorgânicos (Abrantes et al., 2018). Outro aspeto relevante a ter em consideração no processo de bioacumulação de metais, é o facto dos metais tóxicos competirem com os sistemas de absorção de micronutrientes, devido a utilizarem a mesma membrana de transporte, podendo ter interferências na acumulação de determinados elementos (Clemens, 2006).

Relativamente ao ensaio #1-Cinzas de incêndios florestais, a macrófita não se mostrou hiperacumuladora de Fe nem Zn, contudo revelou-se moderadamente hiperacumuladora de Mn a partir do sétimo dia de ensaio. Os valores das concentrações de Fe, tanto na planta como no EAC foram ligeiramente inconsistentes, eventualmente devido à toxicidade da matriz. A inconsistência das concentrações refletiu-se também em percentagens de eficiência inconstantes, embora compreendidas entre 7% e 42%. Deste modo, conclui-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos nem ao longo do tempo de ensaio. Também e considerando os baixos FBC aliado ao facto de as concentrações de Fe acumuladas pela planta não serem estatisticamente significativas, verificou-se que a *Lemna* não foi eficaz na bioacumulação de Fe no presente cenário. No referente ao Zn, denotou-se que a concentração inicial presente no EAC estava acima dos valores recomendados para as plantas, podendo deste modo ter provocado toxicidade e, consequentemente, interferência na absorção de outros elementos. As concentrações de Zn não foram consideradas estatisticamente significativas nem entre tratamentos, nem ao longo do tempo, contrariamente às concentrações de Zn acumuladas pela planta, as quais foram consideradas estatisticamente significativas. No que concerne aos resultados do Mn, é importante destacar a relação entre a toxicidade de Zn e a acumulação de Mn, podendo esta ter sido afetada. Através dos valores obtidos, verificou-se que diferenças das concentrações entre tratamentos e ao longo do tempo, não se revelaram significativas estatisticamente. Contudo os resultados obtidos dos FBC a partir do sétimo dia de ensaio são positivos sendo a *Lemna* considerada moderadamente hiperacumuladora de Mn nas condições do ensaio, existindo diferenças estatisticamente significativas da concentração de Mn acumulada pela planta.

Relativamente aos nutrientes analisados, NH_3 e P, e considerando que as concentrações iniciais se encontravam abaixo dos valores recomendados para o crescimento ótimo, estima-se que

o crescimento/desenvolvimento foi limitado e deste modo pode ter prejudicado a absorção de metais. Contudo, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas das concentrações de NH_3 entre tratamentos e ao longo do tempo. Já as concentrações de P não foram significativas entre tratamentos, contrariamente, às concentrações ao longo do tempo, que foram consideradas estatisticamente significativas.

Relativamente ao caso de estudo #2-Efluente da pasta e papel, a planta revelou alguma acumulação de Fe nos primeiros dias, mas a sua fraca performance ao longo dos 15 dias de exposição revelou que a sua função de acumuladora foi comprometida. Comparando a dinâmica de bioacumulação da planta com as concentrações no efluente com planta ao longo dos quinze dias, verificou-se não serem concordantes. Considerando que o tratamento sem planta apresentou uma tendência muito similar ao tratamento com planta, e observando a redução de Fe na planta a partir do quinto dia, não se pode afirmar que a planta tenha exercido a sua função de acumuladora, e seja o fator responsável pela redução da concentração de Fe no EIPP. No que respeita ao Mn, o desempenho da macrófita mostrou-se favorável devido a capacidade hiperacumuladora de Mn, contudo verificaram-se diferenças significativas das concentrações de Mn, entre ensaios, ao longo do tempo assim como na concentração de Mn acumulada pela planta. Relativamente aos valores dos nutrientes NH_3 e P, as concentrações iniciais de P encontraram-se no intervalo para o crescimento ótimo, contrariamente às concentrações de NH_3 as quais se encontraram abaixo do intervalo ótimo. Considerando que NH_3 é uma das formas de N mais requeridas pela planta e sabendo que as concentrações no efluente se encontravam bastante baixas, ocorreu possivelmente, uma deficiência nutricional, podendo ter comprometido a acumulação de metais.

Deste modo, e tendo por base a literatura (Tabela 3), não descorando todos os fatores que poderão contribuir para o desempenho de acumulação de metais por parte da macrófita, conclui-se que a macrófita quando exposta a matrizes de elevada toxicidade ou com limitação de nutrientes, a sua função acumuladora fica comprometida. Dada a inexistência de estudos de bioacumulação, relativos a cinzas de incêndios florestais ou efluentes da indústria de pasta e papel, não foi possível realizar qualquer tipo de comparação direta.

Perante os resultados obtidos, e considerando a complexidade e potencial toxicidade das matrizes em estudo, é essencial, realizar uma análise química mais detalhada e complexa, nomeadamente estudar os elementos em diferentes formas, podendo deste modo descartar as possibilidades dos elementos estarem numa forma não acumulável para a planta.

Sugere-se ainda em trabalhos futuros, efetuar os ensaios utilizando um sistema de circulação ao invés de um sistema estático como o utilizado no presente estudo. Será ainda importante efetuar

alterações de pH com o intuito de otimizar a eficiência de remoção assim como aferir outras teorias respeitantes à toxicidade dos elementos.

BIBLIOGRAFIA

- (UNIDO), U. N. I. D. O., & (IFDC), I. F. D. C. (1998). *Fertilizer Manual* / Springer (3rd ed.). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Retrieved from http://www.springer.com/in/book/9780792350323?token=gbgen&wt_mc=GoogleBooks.GoogleBooks.3.EN
- Ahmad, P. (2015). *Plant metal interaction : emerging remediation techniques*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00002-3>
- Alexander, D. E. (1999). Bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification. In *Environmental Geology* (pp. 43–44). Springer.
- Ali, M., & Sreekrishnan, T. R. (2001). Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in Environmental Research*, 5(2), 175–196.
- Alonso, M. L., Benedito, J. L., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., & Shore, R. F. (2002). Interactions between toxic and essential trace metals in cattle from a region with low levels of pollution. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(2), 165–172. <https://doi.org/10.1007/s00244-001-0012-7>
- Alvarado, S., Guédez, M., Lué-Merú, M. P., Nelson, G., Alvaro, A., Jesús, A. C., & Gyula, Z. (2008). Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). *Bioresource Technology*, 99(17), 8436–8440.
- Ashrafi, O., Yerushalmi, L., & Haghighat, F. (2015). Wastewater treatment in the pulp-and-paper industry: A review of treatment processes and the associated greenhouse gas emission. *Journal of Environmental Management*, 158, 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.010>
- Axtell, N. R., Sternberg, S. P. K., & Claussen, K. (2003). Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. *Bioresource Technology*, 89(1), 41–48.
- Babić, M., Radić, S., Cvjetko, P., Roje, V., Pevallek-Kozlina, B., & Pavlica, M. (2009). Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium(I)-acetate. *Aquatic Botany*, 91(3), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2009.05.005>
- Baker, M. D., Mayfield, C. I., Inniss, W. E., & Wong, P. T. S. (1983). Toxicity of pH, heavy metals and bisulfite to a freshwater green alga. *Chemosphere*, 12(1), 35–44.
- Basile, A., Sorbo, S., Conte, B., Cobianchi, R. C., Trinchella, F., Capasso, C., & Carginale, V. (2012). Toxicity, accumulation, and removal of heavy metals by three aquatic macrophytes. *International Journal of Phytoremediation*, 14(4), 374–387.
- Bharti, S., & Kumar Banerjee, T. (2012). Phytoremediation of the coalmine effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.009>
- Boening, D. W. (1999). An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 55(3), 459–470. <https://doi.org/10.1023/A:1005995217901>
- Bokhari, S. H., Ahmad, I., Mahmood-Ul-Hassan, M., & Mohammad, A. (2016). Phytoremediation potential of *Lemna minor* L. for heavy metals. *International Journal of Phytoremediation*, 18(1), 25–32.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, 173(4), 677–702.
- Brooks, R. R., Chambers, M. F., Nicks, L. J., & Robinson, B. H. (1998). Phytomining. *Trends in Plant Science*, 3(9), 359–362.
- Bugalho, L., & Pessanha, L. (2009). Análise dos Incêndios Florestais em Portugal e Avaliação do Índice de Risco de Incêndios Florestais (ICRIF). Territorium.
- Campbel, P. G. C., & Stokes, P. M. (1985). Acidification and toxicity of metals to aquatic biota.

- Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(12), 2034–2049.
- Campos, I., Abrantes, N., Vidal, T., Bastos, A. C., Gonçalves, F., & Keizer, J. J. (2012). Assessment of the toxicity of ash-loaded runoff from a recently burnt eucalypt plantation. *European Journal of Forest Research*, 131(6), 1889–1903.
- Censi, P., Spoto, S. E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., ... Ottonello, D. (2006). Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. *Chemosphere*, 64(7), 1167–1176.
- Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: a review. *Oecologia*, 143(1), 1–10.
- Chandra, R., & Singh, R. (2012). Decolourisation and detoxification of rayon grade pulp paper mill effluent by mixed bacterial culture isolated from pulp paper mill effluent polluted site. *Biochemical Engineering Journal*, 61, 49–58.
- Charette, T., & Prepas, E. E. (2003). Wildfire impacts on phytoplankton communities of three small lakes on the Boreal Plain, Alberta, Canada: a paleolimnological study. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(5), 584–593.
- Chaudhuri, D., Majumder, A., Misra, A. K., & Bandyopadhyay, K. (2014). Cadmium removal by *Lemna minor* and *Spirodela polyrrhiza*. *International Journal of Phytoremediation*, 16(11), 1119–1132.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11), 1707–1719.
- Commission, E. (2008). Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC,. *Official Journal of the European Communities*, 84.
- Coors, A., Kuckelkorn, J., Hammers-Wirtz, M., & Strauss, T. (2006). Application of in-situ bioassays with macrophytes in aquatic mesocosm studies. *Ecotoxicology*, 15(7), 583–591.
<https://doi.org/10.1007/s10646-006-0095-z>
- Dirilgen, N. (2011). Mercury and lead: Assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by *Lemna minor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(1), 48–54.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.014>
- Drost, W., Matzke, M., & Backhaus, T. (2007). Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere*, 67(1), 36–43.
- Francis, B. M. (1994). *Toxic substances in the environment*. John Wiley and Sons, Inc.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Markich, S. J., & Lim, R. P. (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology*, 48(2–3), 275–289.
- Ghosh, M., & Singh, S. P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian J Energy Environ*, 6(4), 18.
- Gifford, S., Dunstan, R. H., O'Connor, W., Roberts, T., & Toia, R. (2004). Pearl aquaculture - Profitable environmental remediation? *Science of the Total Environment*, 319(1–3), 27–37.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00437-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00437-6)
- Goswami, C., & Majumder, A. (2015). Potential of *Lemna minor* in Ni and Cr removal from aqueous solution. *Pollution*, 1(4), 373–385.
- Goswami, C., Majumder, A., Misra, A. K., & Bandyopadhyay, K. (2014). Arsenic Uptake by *Lemna minor* in Hydroponic System. *International Journal of Phytoremediation*, 16(12), 1221–1227.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2013.821452>
- Greger, M. (1999). Metal availability and bioconcentration in plants. In *Heavy metal stress in plants* (pp. 1–27). Springer.
- Jacob, J. M., Karthik, C., Saratale, R. G., Kumar, S. S., Prabakar, D., Kadirvelu, K., & Pugazhendhi, A. (2018). Biological approaches to tackle heavy metal pollution: A survey of literature. *Journal*

- of *Environmental Management*, 217, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.077>
- Jain, S. K., Vasudevan, P., & Jha, N. K. (1989). Removal of some heavy metals from polluted water by aquatic plants: Studies on duckweed and water velvet. *Biological Wastes*, 28(2), 115–126. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90075-X](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90075-X)
- Jamwal, P., Mittal, A. K., & Mouchel, J.-M. (2011). Point and non-point microbial source pollution: A case study of Delhi. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 36(12), 490–499.
- Kahmark, K. A., & Unwin, J. P. (1998). Pulp and paper effluent management. *Water Environment Research*, 70(4), 667–690.
- Kanoun-Boulé, M., Vicente, J. A. F., Nabais, C., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2009). Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. *Aquatic Toxicology*, 91(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.09.009>
- Karels, A., Soimasuo, M., & Oikari, A. (1999). Effects of pulp and paper mill effluents on reproduction, bile conjugates and liver MFO (mixed function oxygenase) activity in fish at Southern Lake Saimaa, Finland. *Water Science and Technology*, 40(11–12), 109.
- Keeley, J. E. (2009). Fire intensity, fire severity and burn severity: a brief review and suggested usage. *International Journal of Wildland Fire*, 18(1), 116–126.
- Keller, C., Ludwig, C., Davoli, F., & Wochele, J. (2005). Thermal treatment of metal-enriched biomass produced from heavy metal phytoextraction. *Environmental Science & Technology*, 39(9), 3359–3367.
- Kennish, M. J. (1992). Ecology of Estuaries. Anthropogenic effects. CRC. Press. Inc., Boca Raton F, 1.
- Lacorte, S., Latorre, A., Barceló, D., Rigol, A., Malmqvist, A., & Welander, T. (2003). Organic compounds in paper-mill process waters and effluents. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 725–737. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01009-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01009-4)
- Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae)(Vol. 2.) The family of Lemnaceae-a monographic study. vol. 1. *Veroff Geobot. Inst. ETH*, 71, 1–563.
- Lavorel, S., Flannigan, M. D., Lambin, E. F., & Scholes, M. C. (2007). Vulnerability of land systems to fire: Interactions among humans, climate, the atmosphere, and ecosystems. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 12(1), 33–53.
- Lee, C. W., Choi, J.-M., & Pak, C.-H. (1996). Micronutrient toxicity in seed geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(1), 77–82.
- Liu, C., Dai, Z., & Sun, H. (2017). Potential of duckweed (*Lemna minor*) for removal of nitrogen and phosphorus from water under salt stress. *Journal of Environmental Management*, 187, 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.006>
- Materac, M., & Sobiecka, E. (2017). The efficiency of macrophytes for heavy metals removal from water. *Biotechnology and Food Science*, 81(1), 35–40.
- McCrary, E. (1996). Effect of metals on paper: a literature review. *Alkaline Paper Advocate*, 9(1), 8–9.
- Minshall, G. W. (2003). Responses of stream benthic macroinvertebrates to fire. *Forest Ecology and Management*, 178(1–2), 155–161.
- Mishra, V. K., & Tripathi, B. D. (2008). Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technology*, 99(15), 7091–7097. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.002>
- Mittal, S. K., & Ratra, R. K. (2000). Toxic effect of metal ions on biochemical oxygen demand. *Water Research*, 34(1), 147–152.
- Mkandawire, M., & Dudel, E. G. (2007). Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents? *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 1(1), 56–71.
- Munkittrick, K. R., McMaster, M. E., McCarthy, L. H., Servos, M. R., & Van Der Kraak, G. J. (1998). An overview of recent studies on the potential of pulp-mill effluents to alter reproductive parameters in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B Critical Reviews*,

- 1(4), 347–371.
- Naylor, C., Maltby, L., & Calow, P. (1989). Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiologia*, 188(1), 517–523.
- Nazar, R., Iqbal, N., Masood, A., Khan, M. I. R., Syeed, S., & Khan, N. A. (2012). Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *American Journal of Plant Sciences*, 3(10), 1476.
- Newete, S. W., & Byrne, M. J. (2016). The capacity of aquatic macrophytes for phytoremediation and their disposal with specific reference to water hyacinth. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11), 10630–10643. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6329-6>
- Nunes, B., Silva, V., Campos, I., Pereira, J. L., Pereira, P., Keizer, J. J., ... Abrantes, N. (2017). Off-site impacts of wildfires on aquatic systems—biomarker responses of the mosquitofish *Gambusia holbrooki*. *Science of the Total Environment*, 581, 305–313.
- Núñez-López, R. A., Meas, Y., Gama, S. C., Borges, R. O., & Olguín, E. J. (2008). Leaching of lead by ammonium salts and EDTA from *Salvinia minima* biomass produced during aquatic phytoremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1–3), 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.101>
- Öbek, E. (2009). Bioaccumulation of heavy metals from the secondary treated municipal wastewater by *Lemna gibba* L. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(11a), 2159–2164.
- OECD. (2006). *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. *Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals*. <https://doi.org/10.1787/9789264016194-en>
- Owens, J. W., Swanson, S. M., & Birkholz, D. A. (1994). Environmental monitoring of bleached kraft pulp mill chlorophenolic compounds in a Northern Canadian river system. *Chemosphere*, 29(1), 89–109.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., & Sharma, A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52(3), 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.02.009>
- Peterson, H. G., Healey, F. P., & Wagemann, R. (1984). Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(6), 974–979.
- Pilliod, D. S., Bury, R. B., Hyde, E. J., Pearl, C. A., & Corn, P. S. (2003). Fire and amphibians in North America. *Forest Ecology and Management*, 178(1–2), 163–181.
- Planas, D., Desrosiers, M., Groulx, S.-R., Paquet, S., & Carignan, R. (2000). Pelagic and benthic algal responses in eastern Canadian Boreal Shield lakes following harvesting and wildfires. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(S2), 136–145.
- Podemski, C. L., & Culp, J. M. (1996). Nutrient and contaminant effects of bleached kraft mill effluent on benthic algae and insects of the Athabasca River. *ENVIRONMENTAL FATE AND EFFECTS OF PULP AND PAPER MILL EFFLUENTS*, 571–580.
- Pokhrel, D., & Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review. *Science of the Total Environment*, 333(1–3), 37–58.
- Polprasert, C. (1996). Organic waste recycling: Technology and Management. *John Wiley & Sons: England*, 72.
- Porath, D., & Pollock, J. (1982). Ammonia stripping by duckweed and its feasibility in circulating aquaculture. *Aquatic Botany*, 13, 125–131.
- Prasad, M. N. V., & Freitas, H. M. de O. (2003). Metal hyperaccumulation in plants- Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3), 285–321. <https://doi.org/10.2225/vol6-issue3-fulltext-6>
- Radić, S., Babić, M., Škobić, D., Roje, V., & Pevallek-Kozlina, B. (2010). Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 336–342.

- Rahmani, G. N. H., & Sternberg, S. P. K. (1999). Bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. *Bioresource Technology*, 70(3), 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00050-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00050-4)
- Rajasulochana, P., & Preethy, V. (2016). Comparison on efficiency of various techniques in treatment of waste and sewage water – A comprehensive review. *Resource-Efficient Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.09.004>
- Ranalli, A. (2004). A summary of the scientific literature on the effects of fire on the concentration of nutrients in surface waters. *USDI Geological Survey Open-File Report 2004-1296*, 23. Retrieved from <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA439942>
- Rao, N. K. S., Shivashankara, K. S., & Laxman, R. H. (2016). *Abiotic stress physiology of horticultural crops*. Springer.
- Rengel, Z. (2004). Heavy metals as essential nutrients. In *Heavy metal stress in plants* (pp. 271–294). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-07743-6_11
- Rezania, S., Taib, S. M., Md Din, M. F., Dahalan, F. A., & Kamyab, H. (2016). Comprehensive review on phytotechnology: Heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 587–599. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.053>
- Rinne, J. N. (1996). Management briefs: short-term effects of wildfire on fishes and aquatic macroinvertebrates in the southwestern United States. *North American Journal of Fisheries Management*, 16(3), 653–658.
- Robinson, B. (1999). Phytomining: Growing a crop of metal. *Biologist*, 46(5), 201–205.
- Samecka-Cymerman, A., & Kempers, A. J. (1996). Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macrophytes around Wrocław, Poland. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35(3), 242–247.
- Sasmaz, M., Arslan Topal, E. I., Obek, E., & Sasmaz, A. (2015). The potential of *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. to remove Cu, Pb, Zn, and As in gallery water in a mining area in Keban, Turkey. *Journal of Environmental Management*, 163(October 2017), 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.08.029>
- Sekomo, C. B., Rousseau, D. P. L., Saleh, S. A., & Lens, P. N. L. (2012). Heavy metal removal in duckweed and algae ponds as a polishing step for textile wastewater treatment. *Ecological Engineering*, 44, 102–110.
- Shakesby, R. A., & Doerr, S. H. (2006). Wildfire as a hydrological and geomorphological agent. *Earth-Science Reviews*, 74(3–4), 269–307.
- Sharma, S., Singh, B., & Manchanda, V. K. (2015). Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 946–962.
- Sharma, V., Grag, U., & Arora, D. (2014). Impact of pulp and paper mill effluent on physico-chemical properties of soil. *Scholars Research Library*, 6(2), 12–17.
- Silva, V., Pereira, J. L., Campos, I., Keizer, J. J., Gonçalves, F., & Abrantes, N. (2015). Toxicity assessment of aqueous extracts of ash from forest fires. *Catena*, 135, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.06.021>
- Silva, V., Pereira, J. L., Gonçalves, F., Keizer, I. J., & Abrantes, N. (2016). Efeitos dos fogos florestais nos sistemas aquáticos. *Captar*, 6(2), 68–77.
- Slade, A. H., Ellis, R. J., vanden Heuvel, M., & Stuthridge, T. R. (2004). Nutrient minimisation in the pulp and paper industry: an overview. *Water Science and Technology : A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 50(3), 111–122.
- Sodré, F. F. (2012). Fontes Difusas de Poluição da Água: Características e métodos de controle. *Agricultura*, 1(1), 9–16.
- Sood, A., Uniyal, P. L., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2012). Phytoremediation potential of

- aquatic macrophyte, *Azolla*. *Ambio*, 41(2), 122–137. <https://doi.org/10.1007/s13280-011-0159-z>
- Stafilev, T., & Karadjova, I. (2009). Atomic Absorption Spectrometry in Wine Analysis – a Review –. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 28(1), 17–31.
- Stolle, F., Chomitz, K. M., Lambin, E. F., & Tomich, T. P. (2003). Land use and vegetation fires in Jambi Province, Sumatra, Indonesia. *Forest Ecology and Management*, 179(1–3), 277–292. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00547-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00547-9)
- Tanhan, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., & Chaiyarat, R. (2007). Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere*, 68(2), 323–329.
- Tatar, Ş. Y., & Öbek, E. (2014). Potential of *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. for accumulation of Boron from secondary effluents. *Ecological Engineering*, 70, 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.06.033>
- Teixeira, S., Vieira, M. N., Marques, J. E., & Pereira, R. (2014). Bioremediation of an iron-rich mine effluent by *Lemna minor*. *International Journal of Phytoremediation*, 16(12), 1228–1240.
- Thirumalini, S., & Joseph, K. (2009). Correlation between electrical conductivity and total dissolved solids in natural waters. *Malaysian Journal of Science*, 28(1), 55–61.
- Tiku, D. K., Kumar, A., Sawhney, S., Singh, V. P., & Kumar, R. (2007). Effectiveness of treatment technologies for wastewater pollution generated by Indian pulp mills. *Environmental Monitoring and Assessment*, 132(1–3), 453–466.
- Toczyłowska-Mamińska, R. (2017). Limits and perspectives of pulp and paper industry wastewater treatment—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 764–772.
- Török, A., Gulyás, Z., Szalai, G., Kocsy, G., & Majdik, C. (2015). Phytoremediation capacity of aquatic plants is associated with the degree of phytochelatin polymerization. *Journal of Hazardous Materials*, 299, 371–378.
- Uysal, Y., & Taner, F. (2009). Effect of pH, temperature, and lead concentration on the bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. *International Journal of Phytoremediation*, 11(7), 591–608.
- Valipour, A., & Ahn, Y.-H. (2016). Constructed wetlands as sustainable ecotechnologies in decentralization practices: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(1), 180–197.
- Vesely, J., & Majer, V. (1996). THE EFFECT OF pH AND ATMOSPHERIC DEPOSITION ON CONCENTRATIONS OF TRACE ELEMENTS IN ACIDIFIED FRESHWATERS : A STATISTICAL APPROACH There are many factors controlling the concentrations of trace elements in freshwaters, e. g. sorption onto particles (, 227–246.
- Vidaković-Cifrek, Ž., Tkalec, M., Šikić, S., Tolić, S., Lepeduš, H., & Pevalek-Kozlina, B. (2015). Growth and photosynthetic responses of *Lemna minor* L. exposed to cadmium in combination with zinc or copper. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(2), 141–152. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2618>
- Vinagre, C., Cabral, H. N., & Caçador, I. (2008). Influence of halophytes and metal contamination on salt marsh macro-benthic communities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(4), 715–722.
- Volesky, B. (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, 59(2–3), 203–216. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00160-2)
- Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 427–451. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.001>
- Weis, J. S., & Weis, P. (2004). Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environment International*, 30(5), 685–700.
- Welch, R. M., & Shuman, L. (1995). Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(1), 49–82.

- Wilde, E. W., & Benemann, J. R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*, 11(4), 781–812. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(93\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0734-9750(93)90003-6)
- Yeber, M. C., Rodríguez, J., Freer, J., Durán, N., & Mansilla, H. D. (2000). Photocatalytic degradation of cellulose bleaching effluent by supported TiO₂ and ZnO. *Chemosphere*, 41(8), 1193–1197.
- Yen, N. T., Oanh, N. T. K., Reutergardh, L. B., Wise, D. L., & Lan, N. T. T. (1996). An intergrated waste survey and environmental effects of COGIDO, a bleached pulp and paper mill in Vietnam, on the receiving waterbody. *Resources, Conservation and Recycling*, 18(1–4), 161–173.
- Yilmaz, D. D., & Akbulut, H. (2011). Effect of circulation on wastewater treatment by *Lemna gibba* and *Lemna minor* (Floating aquatic macrophytes). *International Journal of Phytoremediation*, 13(10), 970–984. <https://doi.org/10.1080/15226514.2010.532242>
- Zayed, A., Gowthaman, S., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, 27(3), 715–721.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., & Jiang, G. (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606(2), 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.018>

